Aus dem agriculturchemischen und bakteriologischen Institut
der Königl. Universität Breslau.

Über die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus.

Inaugural-Dissertation,

welche

nebst beigefügten Thesen

mit Genehmigung

der Hohen Philosophischen Fakultät der Königl. Universität Breslau

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

am Dienstag, den 11. August 1903, Vormittags 10 Uhr,

in der Aula Leopoldina

öffentlich verteidigen wird

RICHARD RIECKE

Assistent am agriculturchem. u. bakteriol. Institut
der Königl. Universität Breslau.

Opponenten:

Dr. phil. Carl Bloch,

Dr. phil. Albert Einecke.

Wolfenbüttel 1903.
Druck der Hecknerschen Druckerei.

Aus dem agriculturchemischen und bakteriologischen Institut
der Königl. Universität Breslau.

Über die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus.

Inaugural-Dissertation,

welche

nebst beigefügten Thesen

mit Genehmigung

der Hohen Philosophischen Fakultät der Königl. Universität Breslau

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

am Dienstag, den 11. August 1903, Vormittags 10 Uhr,

in der Aula Leopoldina

öffentlich verteidigen wird

RICHARD RIECKE

Assistent am agriculturchem. u. bakteriol. Institut
der Königl. Universität Breslau.

Opponenten:

Dr. phil. Carl Bloch,

Dr. phil. Albert Einecke.

Wolfenbüttel 1903.

Druck der Hecknerschen Druckerei.

Meinen lieben Eltern!

Der Verfasser.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548201_0060

Über die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus.

I. Einleitung.

Schon am Ende des 18. Jahrhunderts hatten die Franzosen Rouelle, Fourcroy und Vauquelin die Hippursäure aus dem Harne von Pferden und Kühen dargestellt, aber nicht als solche erkannt, sondern für Benzoesäure gehalten. Erst Liebig erkannte die Hippursäure als eine selbständige Verbindung und gab ihr nach ihrem Vorkommen im Pferdeharn, aus dem er sie zuerst darstellte, darnach den Namen Hippursäure. Später fand er sie auch als einen normalen Bestandteil des menschlichen Harnes, jedoch kommt sie in reichlicheren Mengen, d. h. in Mengen von 1,2 bis 2,7 % nur im Harne der Pflanzenfresser vor; in dem des Menschen und der Fleischfresser überschreitet die Tagesausscheidung, abgesehen von pathologischen Erscheinungen wie Diabetes, nur bei ausschließlicher Pflanzenkost 0,7 bis 1,3 gr. Weiter wurde Hippursäure dann im Guano, in den Exkrementen von testudo Graeca und tabulata, ferner in den Exkrementen von Raupen, Schmetterlingen und Habichtsmotten gefunden. Künstlich steigert man die Hippursäureausscheidung durch Verfütterung von Zimmtsäure, Toluol, Bittermandelöl, Chinasäure, Phenylpropionsäure u. s. w., also durch Zufuhr aromatischer Körper, die in der Blutbahn zu Benzoesäure oxydiert werden, mit Glycocoll sich vereinigen und schließlich im Harn als Hippursäure zur Abscheidung gelangen.

Bei Verfütterung reiner Benzoesäure konnte jene sogar z. B. im Wollschweiß von Schafen nachgewiesen werden, für den Nachweis im Blute dagegen fehlen bis jetzt noch nähere Anhaltspunkte. Die Hippursäure gehört demnach zu den aromatischen Harnbestandteilen, welche einerseits durch bakterielle Zersetzung von Eiweisstoffen oder deren Verdauungsprodukten im Darm entstehen und in der Leber durch die Vereinigung mit Schwefelsäure zu »Esterartigen Verbindungen« entgiftet, andererseits aus den Benzolderivaten vegetabilischer Nahrungsmittel gebildet werden. Die Synthese der Hippursäure aus Benzoesäure und Glycocoll ist bekannt und feststehend; sie vollzieht sich nach Bunge und Schmiedeberg im allgemeinen in den Nieren, bei einigen Tieren, wie Kaninchen und Fröschen, aber auch in anderen Organen, dagegen herrschen über die Muttersubstanz der Hippursäure noch die verworrensten Ansichten.

Wie bereits erwähnt, findet sich die Hippursäure im reichsten Maße im Harn der Pflanzenfresser, doch auch hier nach der jeweiligen Art der Fütterung in sehr wechselnden Mengen. So fanden Henneberg, Stohmann und Rautenberg im Kuhharn bei Verfütterung von Cerealienstroh 2,1 bis 2,7 %, von Wiesenheu 1,2 bis 1,4 %, von Kleeheu dagegen oder Stroh der Leguminosen nur 0,4 % Hippursäure. Auch der Harn von Kaninchen enthält bei Verfütterung von rohfaserreichen Substanzen viel Hippursäure, die sofort zurückgeht, wenn Brot, enthülste Erbsen oder Kleeheu gefüttert wird. Im Harne von Kühen, die tagsüber auf der Weide gewesen waren, fand Kraut pro Liter bis zu 8 g Hippursäure, während der Morgenharn der im Stalle gefütterten Kühe erheblich weniger enthielt. Pettenkofer konstatierte bei der Untersuchung des Harnes eines Menschen, der nur mit Brot, Obst und Wasser ernährt wurde, daß in diesem speziellen Falle verhältnismäßig ebensoviel Hippursäure erzeugt wurde, wie bei den Pflanzenfressern; bei gemischter Kost dagegen fand Weismann im menschlichen Harn nur 2,4 g, bei rein animalischer Ernährung sogar nur 0,76 g.

Keller und Wöhler haben zuerst beobachtet, daß im tierischen Organismus Benzoesäure in Hippursäure übergeführt wird, und als solche dann zur Abscheidung gelangt. Daher lag wohl die

Vermutung nahe, daß Stoffe, welche verhältnismäßig reich an Benzoesäure, bezw. an solchen Substanzen sind, die im Tierkörper zu Benzoesäure oxydiert zu werden vermögen, die Muttersubstanz der Hippursäure enthalten. Dagegen ist es bis jetzt noch nicht gelungen, Benzolderivate gerade in Cerealienstroh oder Wiesenheu nachzuweisen, die doch die Hauptbildner der Hippursäure vorstellen.

Meißner und Shepard [1]) vertreten die Ansicht, daß die Rohfaser es ist, welche die Bildung der Hippursäure veranlaßt, und von der Rohfaser die Cuticularsubstanz am meisten in Betracht zu ziehen sei, jedoch geben sie selbst zu, daß der Weg, auf welchem sie zu diesem Schlusse gelangten, keine absolute Sicherheit biete. Eine ganz ähnliche Ansicht vertritt Weismann, der das Lignin, also auch einen Teil der Gesamtrohfaser, als Hippursäurequelle ansieht. Dagegen scheint aber die Erfahrung zu sprechen, daß andererseits Leguminosenstroh oder Kleeheu, die doch jedenfalls auch über eine genügende Menge Rohfaser verfügen, fast gar keine oder doch nur sehr wenig Hippursäure zu bilden vermögen. Für die Entscheidung dieser Frage finden sich in der Literatur bereits einige ältere Arbeiten, die nicht unerwähnt bleiben dürfen.

II. Literatur und ihre kritische Betrachtung.

Hierher gehört zunächst die Arbeit von Stutzer [2]) über die Rohfaser der Gramineen. Er stellt dort folgende Frage auf: »Sind Benzolverbindungen in der Rohfaser praeformiert enthalten, die zur Bildung von Hippursäure im tierischen Organismus der Pflanzenfresser direkt Veranlassung geben?«

Er stellte sich aus einer Grasart, die keinerlei Art von Beimengungen wie Klee, Unkrautpflanzen, oder dergleichen enthielt, in der Art eine genügende Portion Rohfaser her, daß er die feingemahlene Substanz mit einer verdünnten Schwefelsäure von 4 % H_2SO_4-Gehalt, (Auswaschen der Säure), darauf mit

[1]) Journ. f. prakt. Ghemie, 1858, S. 106.

[2]) Landwirtschaftl. Versuchsstat. 1875, Bd. 18, S. 364.

verdünnter Natronlauge von 4 % Na_2O-Gehalt (Auswaschen der Lauge), je $^1/_2$ Stunde kochte. Die Rohfaser wurde noch öfter mit Alkohol behandelt, und nachdem dieselbe bei 100° getrocknet war, gelangte er zu einem Produkt, welches durch die Elementaranalyse über einstimmende Zahlen mit den Resultaten anderer Forscher, wie Henneberg und Meißner, ergab. Diese Rohfaser wurde nun auf die verschiedenste Art oxydiert, aber sowohl die Behandlung mit conzr. Salpetersäure, mit verdünnter Schwefelsäure, mit rauchender Salpetersäure, wie auch schließlich mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure führten zu keinem Resultat; Oxalsäure, Bernsteinsäure und Korksäure waren die Endergebnisse, und dieses veranlaßte Stutzer zu dem Schluß, die Frage, ob Benzolverbindungen in der Rohfaser praeformirt enthalten seien, zu verneinen. Hierzu ist zunächst zu bemerken, daß zur Herstellung von Rohfaser nach der allgemein üblichen Methode nicht Schwefelsäure, bezw. Natronlauge von 4 % Gehalt angewandt werden, sondern solche von nur 1,25 %. Es wäre also nicht unmöglich, daß Stutzer durch Anwendung konzentrierterer Reagenzien die in der Rohfaser event. enthaltenen aromatischen Substanzen gelöst hat und schon deshalb zu keinem positiven Resultat gelangt ist. Wenn man aber annimmt, daß diese Möglichkeit nicht eingetroffen ist, so ist wohl Salpetersäure, mit der nur ein kleiner Teil der Seitenketten des Benzolkerns oxydiert zu werden vermag, ein zu schwaches Oxydationsmittel; wenn aber trotzdem eine Oxydation zu Benzoesäure erreicht wird, so konnte Stutzer dieses nie feststellen, da er in offenen Gefäßen auf kochendem Wasserbade arbeitet, und daher die Benzoesäure, die bekanntlich mit Wasserdämpfen flüchtig ist, in die Luft gejagt wird. Auch Chromsäuregemisch ist nur ein verhältnismäßig gelindes Oxydationsmittel, wenn daher Stutzer zu einem Resultat gelangen wollte, mußte er entweder mit Kaliumpermanganat in alkalischer oder saurer Lösung arbeiten, oder gar eine Oxydation in schmelzendem Kali versuchen, wodurch eine Oxydation der Benzolderivate bei genügend langer Oxydationsdauer zu Salicylsäure stattfindet.

Die zweite Arbeit, die ebenfalls an die alten Untersuchungen von Meißner und Shepard knüpft, ist von V. Hofmeister und

findet sich im Original ebenfalls in den landwirtschaftlichen Versuchsstationen.[1]) Hofmeister knüpft an folgende beiden Sätze an, die Meißner auf Grund sehr zahlreicher Versuche aufgestellt hat:

1) daß Tiere, speziell Kaninchen, von dem für alle gewöhnlichen Lösungsmittel völlig unlöslichen Pflanzengewebe, d. h. von den Substanzen, aus welchen die unlöslichen Teile der Pflanzenzellwände bestehen, einen Teil verdauen, also in ihrem Darme löslich machen und resorbieren,
2) daß unter diesem verdauten Teile eine oder geradezu die Substanz vorhanden ist, von deren Aufnahme und Eingehen in den Stoffwechsel die Bildung der Hippursäure abhängt.

Da nun, so schließt Hofmeister, die verfütterte Rohfaser, abgesehen von einem geringen Gehalt an Mineralsubstanzen, aus Cellulose und den sog. inkrustierenden Substanzen besteht, die Cellulose aber, und von den inkrustierenden Substanzen die als Intercellularsubstanz zu betrachtende Lignin-Korksubstanz und die Pektose zur Hippursäurebildung beziehungslos sind, bleibt eben nur eine Substanz übrig, die in Frage kommen kann, die Cuticularsubstanz, worunter man im allgemeinen die von Mohl als »Cuticularschichten der Epidermis« bezeichnete Substanz versteht, welche in caustischem Kali unlöslich, die ganze, der Luft ausgesetzte Oberfläche der höheren Pflanzen überzieht, an den unterirdischen Pflanzenteilen dagegen fehlt. Nach Angaben Hofmeisters beobachtete Kolbe, daß Kühe, die immer große Mengen von Hippursäure geliefert hatten, plötzlich nur noch geringe Mengen dieser Säure ausschieden. Der Grund hierfür lag im Wechsel in der Fütterung, denn die Tiere erhielten jetzt statt Wiesenheu Kleeheu. Die Cuticularsubstanz ist aber in den Stengeln und Blättern des Klees ebenso vertreten, wie beim Wiesenheu, und wenn auch die Rohfaser des Klees schwerer verdaulich ist, als die des Wiesenheus, so ist immer noch ein derartiger Unterschied in der Hippursäureausscheidung unerklärlich. Hofmeister meint daher, man dürfe die Frage über die Muttersubstanz der Hippur-

[1]) Landw. Versuchsst. Bd. 14, S. 458.

säure keineswegs als erledigt oder gelöst betrachten, sondern man müsse mit Kolbe annehmen, daß tatsächlich im Wiesenheu aromatische Substanzen vorhanden seien, welche die Bildung der Hippursäure bedingten, die jedoch im Kleeheu fehlten. Dieses ist der Gegenstand seiner Untersuchungen, und Kleeheu sollte die Basis aller seiner Versuche sein.

Er stellte sich durch successives Behandeln von Wiesenheu mit kochendem Wasser, Alkohol und 3prozentiger Natronlauge verschiedene Extrakte und Rückstände her, die er nach vorhergegangenem Eindampfen resp. Trocknen an Hammel verfütterte. Er gelangte hierbei zu dem sehr eigentümlichen Ergebnis, daß nur der Alkoholextrakt, der zu einer Grundration, aus Kleeheu bestehend, verfüttert wurde, eine Vermehrung der Hippursäureausscheidung bewirkte, aber auch nur in einem derartig geringen Grade, daß die Hippursäurebildungsfähigkeit des ursprünglichen Wiesenheus nicht im entferntesten dadurch gedeckt zu werden vermochte. Auch Versuche, die Hofmeister an sich selbst machte, führten zu keinem erklärenden Ergebnis. Es ist einleuchtend, daß durch Kochen des Heues die Eiweisssubstanzen desselben wohl zum größten Teile coarguliert sind, und infolgedessen nicht ins Filtrat, also auch nicht zur Fütterung gelangten. Es ist aber, wie wir später sehen werden, Eiweiß für die Bildung von Hippursäure nicht ganz belanglos, da die aromatischen Spaltungsprodukte desselben sehr wohl im Tierkörper zu Benzoesäure oxydiert zu werden vermögen und deshalb nach den Versuchen von Hofmeister in Fortfall kommen. Wo der übrige Teil der Muttersubstanz der Hippursäure bei der erwähnten Behandlung des Wiesenheus geblieben ist, bezw. welche durchgreifenden Veränderungen sie dabei erfahren hat, darüber finden sich keine Andeutungen, und man kann sich daher kaum ein Urteil bilden, welches irgend einen festen Anhalt böte. Hofmeister schließt seine Arbeit mit dem Satze, daß von den Nährstoffgruppen der Futtermittel Fett- und Kohlenhydrate als Hippursäurebildner ganz ausgeschlossen seien, daß also wohl einerseits die Proteinstoffe, hauptsächlich aber trotz der widersprechendsten Erscheinungen die Rohfaser in Frage kommen, daß jedoch die ungenügende Kenntnis dieser Stoffe die Lösung der Frage verhindert.

Zu ganz anderen Ergebnissen gelangte wieder Weiske[1]), der neben Versuchen mit den verschiedensten Futtermitteln schließlich in ähnlicher Weise wie Hofmeister verfuhr. Er konstatierte, daß bei Verfütterung von Bohnen und Weizen die Hippursäureausscheidung ein starkes Sinken erfuhr, welches sich bei Gabe von Kartoffeln noch steigerte. Verfütterte Salicylsäure änderte wenig oder gar nichts an der normalen Ausscheidung, dagegen wurde durch Verfütterung von Benzoesäure in steigenden Mengen von 5 bis 15 g pro Tag die alte Erfahrung bestätigt, daß sie zum großen Teile, wenn auch nicht quantitativ im Harn wieder zur Abscheidung gelangte. W. v. Schröder[2]) will die an Hammel verfütterte Benzoesäure sogar quantitativ, und zwar mit Hilfe der Bunge-Schmiedebergschen Methode, im Harn als Hippursäure wiedergefunden haben. Es ist dieses um so auffallender, als erstens die eben erwähnte Methode nach unserer Prüfung[3]) unter allen Umständen im Harne zu niedrige Resultate gibt, andererseits der Nachweis erbracht ist, daß besonders bei etwas hohen Gaben die verfütterte Benzoesäure im Harn als solche wieder abgeschieden wird. Auch Erbsen, Hafer, sowie das Stroh und Heu von Leguminosen bewirkten ein starkes Sinken in der Hippursäureausscheidung, sodaß schließlich nur noch 0,5 g pro Tag nachgewiesen werden konnten. Weiske behandelte nun Wiesenheu in großen Bottigen mit verdünnter Schwefelsäure einerseits, mit verdünnter Kalilauge andererseits, beide von 1,25 % Gehalt, hierauf wurde nach 24stündigem Stehen die Säure resp. Lauge vollständig mit Wasser ausgewaschen und der Rückstand getrocknet. Das mit Kalilauge extrahierte Heu bewirkte einen deutlichen Rückschritt der Hippursäurebildung, das mit Schwefelsäure behandelte vermochte überhaupt keine Hippursäure, oder doch nur quantitativ nicht mehr nachweisbare Spuren zu erzeugen. Weiske glaubte daher aufgrund dieser Ergebnisse annehmen zu dürfen, daß die Muttersubstanz der Hippursäure in Kalilauge zum Teil, in verdünnter Schwefelsäure fast vollständig löslich ist. Hierdurch wäre allerdings dann die von Meißner und Shepard vertretene

[1]) Zeitschrift für Biologie, Bd. 12, S. 241.
[2]) Zeitschr. für physiologische Chemie Bd. 3, 1879, S. 326.
[3]) Mitteil. d. landw. Inst. d. Univ. Breslau Bd. 2, S. 289.

Ansicht, daß die Cuticularsubstanz als Quelle der Hippursäure anzusehen sei, hinfällig. Wir haben also in diesen beiden letzterwähnten Arbeiten zwei einander widersprechende Resultate; denn während Weiske fand, daß die Hippursäure bildende Substanz fast völlig löslich in verdünnter Schwefelsäure ist, dagegen weniger löslich in Kalilauge, kam Hofmeister zu dem Resultat, daß Behandeln des Heues mit Wasser, Alkohol und 3prozentiger Kalilauge die Hippursäurebildungsfähigkeit fast vollständig aufhebt. Interessant sind die Resultate Weiskes, daß Benzoesäure zu einem Futter wie Kartoffeln oder dergl., also einem Futter, welches nur Spuren von Hippursäure zu bilden vermag, gegeben, nicht wie man annehmen sollte, als Hippursäure, sondern als Benzoesäure ausgeschieden wurde. Weiske glaubt hieraus schließen zu dürfen, daß nicht unter allen Umständen die Benzoesäure im Tierkörper in Hippursäure übergeführt wird, eine Annahme, der ich mich nicht anzuschließen vermag, da doch notwendig die Benzoesäure auf dem Wege durch den Körper mit dem Glycocoll in Berührung kommt und sich mit diesem zu Hippursäure vereinigen muß. Aber, wie bemerkt, müssen diese Versuche Weiskes notwendigerweise wiederholt werden, zumal durch Auffindung einer neuen Methode zur Bestimmung der Hippursäure die ganze Frage in eine andere Phase gerückt ist, wie ich im weiteren Laufe meiner Arbeit darlegen werde.

Eine neue Wendung gaben Th. Pfeiffer, Eber, Götze und Müller[1]) der Frage über die Bildung der Hippursäure, indem sie durch eine frühere Veröffentlichung von Götze und Pfeiffer,[2]) Beiträge zur Frage über die Bildung resp. das Verhalten der Pentaglycosen im Pflanzen- und Tierkörper, auf den Gedanken gekommen waren, daß die im Futter vorhandenen Pentosen in irgendwelcher Beziehung zur Bildung der Hippursäure ständen. Wie aus den Versuchen von Weismann, Henneberg u. Stohmann, Meißner u. Shepard, Hofmeister, Weiske u. a. zur Genüge hervorgeht, sind es in erster Linie die Rauhfutterstoffe, welche für die Bildung der Hippursäure in Betracht kommen, und von diesen

[1]) Landw. Versuchsstat. 1898, Bd. 49, S. 97.
[2]) Landw. Versuchsstat. 1896, Bd. 47, S. 59.

hauptsächlich wieder ihr Gehalt an Rohfaser. Obwohl nun das Heu und Stroh der Leguminosen ebenfalls sehr reich an Rohfaser ist, schließen Pfeiffer und seine Mitarbeiter, könnten es sehr wohl die Pentosen sein, die zur Bildung der Hippursäure beitragen, da aus der früher erwähnten Arbeit, sowie auch aus anderen Untersuchungen hervorgeht, daß die Cerealien mehr Pentosen enthalten, wie die Leguminosen.

So hat denn auch eine Beigabe von Pentosen zum Normalfutter eine Erhöhung der Hippursäureausscheidung zur Folge gehabt, und da sich die Pentosane resp. Pentosen im Darm der Wiederkäuer abweichend von dem der Menschen verhalten, in dessen Organismus sie dem Zerfall größeren Widerstand entgegensetzen, schienen sie in unmittelbarer Beziehung zur Bildung der Hippursäure zu stehen. Eine Tatsache allerdings, so führen Pfeiffer und seine Mitarbeiter weiter aus, scheint gegen eine Beteiligung der Pentosane zu sprechen, und das sei das sich aus älteren Versuchen ergebende Verschwinden der Hippursäure bei Fütterung von Conglutin oder Fleischmehl. Denn da hierbei keine Verminderung der verdauten Mengen Rohfaser und stickstoffreier Extraktstoffe stattfindet, darf auch die Verdaulichkeit der Pensosane keineswegs leiden. Jedoch können die Zersetzungserscheinungen im Darm unter dem Einfluss verschiedener Futterzulagen eine verschiedenartige Gestaltung annehmen, es könnte z. B. die Eiweißzufuhr die Bildung aromatischer Produkte aus Pentosanen beeinträchtigen oder gar verhindern. Daß dies nicht der Fall ist, daß weder Kohlenhydrate, noch Conglutin, Fleischmehl oder irgend ein anderes Eiweißpräparat die Bildung von Hippursäure beeinträchtigt oder verhindert, daß sogar die aromatischen Gruppen der Eiweißkörper höchstwahrscheinlich noch zur Bildung von Benzoesäure durch Oxydation beitragen, werde ich im weiteren Verlaufe meiner Arbeit durch selbstgemachte Versuche beweisen.

O. Loew[1]) glaubt, Chinasäure aus Wiesenheu isoliert zu haben, von der man weiß, daß sie im Organismus zu Benzoesäure überzugehen vermag; jedoch vollzieht sich dieser Vorgang

[1]) Journ. für prakt. Chemie Bd. 127, S. 309 u. ebend. Bd. 128, S. 476.

nur zu einem geringen Prozentsatze, und außerdem gehen seine Versuche über allerdings vielleicht nicht unbegründete Mutmaßungen nicht hinaus, denn den klaren Beweis für die Identität seines gefundenen Produktes mit der Chinasäure bleibt er uns schuldig.

Über die Einwirkung von Chinasäure auf Harnsäure und Hippursäure liegt jetzt eine ganz neue Arbeit von Franz Hupfer[1]) vor, die uns sehr interessante Enthüllungen über die Beeinflussung der Harnsäure seitens der Chinasäure gibt. Er machte die Versuche an sich selbst, aß während verschiedener Perioden nach einander Chinasäure, frische Trauben und getrocknete Kirschen, und kam zu dem Schluß, zu welchem auch schon Förster[2]) bei Verfütterung von Chinasäure und ihren Salzen gelangt war, daß diese nämlich keinen maßgebenden Einfluß auf die Bildung von Hippursäure auf Kosten der Harnsäure hat. Damit fällt er die letzte Stütze der Theorie des Antagonismus von Hippursäure und Harnsäure. Jedoch dürfen meiner Ansicht nach diese Versuche nicht verallgemeinert werden, auf den Tierkörper passen sie nicht immer. Schon durch alte Versuche von Meißner und Shepard und durch weitere von E. Stadelmann[3]) ist bekannt, daß nach Einverleibung von Chinasäure an Fleischfresser keine Hippursäurebildung stattfindet, bei Pflanzenfressern dagegen sehr wohl, wenn auch das Mengenverhältnis für Hippursäure bedeutend geringer ist, und vermehrtes Auftreten derselben erst bei längerer Zeit der Fütterung erfolgt.

Selbstverständlich ist nicht Chinasäure die einzige Substanz, welche die Bildung der Benzoesäure im Organismus veranlaßt, weil sonst der Nachweis jener in Futtermitteln unbedingt gelungen wäre; immerhin wäre doch aber bei ihrem bestimmten Nachweis ein Anhaltspunkt für die Lösung der Frage über die Muttersubstanz der Hippursäure gegeben.

[1]) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie 1903, Bd. 37, S. 302.
[2]) Ebend. Bd. 37, S. 312.
[3]) Jahresbericht für Tierchemie Bd. 9, S. 180.

III. Synthese der Hippursäure.

Bevor ich zur Beschreibung der meiner Arbeit zu Grunde liegenden Versuche übergehe, dürfte es nicht unangebracht sein, in kurzen Zügen einen Überblick über die in der neueren Literatur herrschende Ansicht betreffs der Synthese der Hippursäure resp. ihrer Komponenten zu geben. Die Synthese der Hippursäure aus Benzoesäure und Glycocoll steht fest; die erstere ist in den Nahrungsstoffen in einer noch unbekannten Form enthalten und wird durch diese dem Körper zugeführt, während letzteres vom Tierkörper zugeschossen wird; beide vereint, geben Hippursäure und verlassen als solche den Tierkörper. Das Glycocoll wird aus nicht näher bekannten Gewebsbestandteilen abgespalten, und die Vereinigung dieses Körpers mit der Benzoesäure geht z. B. beim Hunde nur in den Nieren vor sich, aber hier selbst noch in bereits ausgeschnittenen Organen, beim Kaninchen und Frosch dagegen wurde auch nach der Nephrotomie zur Resorbtion gelangte Benzoesäure nach W. Salomon[1]) in der Leber und in den Muskeln als Hippursäure wieder aufgefunden, die demnach bei diesen Tieren wohl auch noch in anderen Organen als in den Nieren entstehen kann.

Nähere Untersuchungen über die Entstehung des Glycocolls im tierischen Organismus liegen von A. Jolles[2]) vor, der es als ein intermediäres Produkt der Oxydation der Eiweißkörper zu Harnstoff bezeichnet. Es ist ihm gelungen, aus Hippursäure durch Oxydation in saurer Lösung mit Kaliumpermanganat das Glycocoll in Harnstoff quantitativ überzuführen. Er behauptet daher, daß z. B. Eiweißkörper, deren Zerfall im Tierkörper Glycocoll liefern könnte, — wie sowohl durch direkte Zersetzung, als auch durch die Bildung von Hippursäure im Falle der Anwesenheit der anderen Komponente, der Benzoesäure, nachgewiesen ist — wahrscheinlich zunächst Glycocoll abzuspalten vermögen, welches, wenn es nicht durch Benzoesäure vor weiterer Oxydation geschützt wird, in Harnstoff übergeht. Es liegt des-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 3, 1879, S. 365. Hier findet sich auch die ältere Untersuchung von Meißner und Shepard besprochen.

[2]) Pflügers Archiv für die ges. Physiologie 82, S. 557.

halb, meint A. Jolles, die Annahme nahe, daß bei der Oxydation der Eiweißkörper zu Harnstoff wenigstens in den Zwischenstufen Glycocoll oder auch andere Amidosäuren aufzutreten vermöchten, die dann im weiteren Verlaufe des Oxydationsprozesses zu Harnstoff oxydiert werden.

H. Wiener [1]) ist betreffs der Bildung von Glycocoll anderer Ansicht; es sei nicht als ein intermediäres Stoffwechselprodukt beim Eiweißabbau aufzufassen, da bei Verabreichung von Benzoesäure an Kaninchen auch Harnsäure in Glycocoll übergeführt würde, und die Benzoesäure zu entgiften vermochte, ebenso auch Leucin. Organische Ammonsalze dagegen und auch Fleischsäure waren ohne Einfluß auf den erwähnten Prozeß. Ob aber tatsächlich nicht trotzdem Glycocoll ein intermediäres Zerfallprodukt der Eiweißkörper sein kann, scheint mir durch die Untersuchungen Wieners nicht bewiesen zu sein.

Auch über die Frage, ob die physiologische Synthese der Hippursäure ein vitaler, mit enzymatischen Vorgängen verknüpfter Prozeß ist, oder ob die Hippursäure auf rein chemischem Wege gebildet wird, herrscht noch keine vollständige Klarheit. Berninzone[2]) faßt den physiologischen Vorgang so auf, daß keine Trennung von vitalen und enzymatischen Vorgängen gemacht werden dürfe, wofür die Reversibilität, die für einige Enzyme, wie die Maltose, das von Berninzone angenommene Hippursäureferment, und die Lipase erwiesen ist, spricht; daß man es mit einem Ferment zu tun hat, geht daraus hervor, daß die Synthese ausbleibt, wenn man die Nierenpulpa kocht und so das Enzym abtötet. Die Reaktionen gehen, so behauptet Berninzone, von 2 verschiedenen Systemen aus, um zum selben Gleichgewichtspunkt zu gelangen, und das thermische Zeichen der vorhergehenden Transposition ist ohne Einfluß auf die endgiltige Gleichgewichtseinstellung. Daher meint er auch, daß man bei Beurteilung der katalytischen Vorgänge sich nicht von thermischen Faktor allein leiten lassen darf, sondern aus der Reversibilität der katalytischen Vorgänge käme man zu dem Schluß, daß diese nicht nur ein-

[1]) Wiener Maly's Jahresbericht über die Fortschr. der Tierchemie, Bd. 28, S. 576.

[2]) Malys Jahresber., Bd. 31, Seite 708.

seitig als endothemisch und als Ursache chemischer Spaltungen aufgefaßt werden dürfen, sondern daß sie sich vielmehr, wenn auch nicht alle, so doch zum Teil, gleichmäßig thermisch nach beiden Seiten hin abspielen können und auch zu Synthesen Anstoß zu geben vermögen.

Genau die entgegengesetzte Ansicht vertreten E. Bashford und W. Kramer[1]), welche behaupten, daß die Synthese der Hippursäure ein durch einen Bestandteil der Niere veranlaßter Vorgang von rein chemischer Natur ist. Die Nieren eines Hundes wurden mit Glassplittern zerstampft, mehrmals mit Glas durch eine Fleischhackmaschine getrieben und nochmals im Mörser zu feinstem Brei verrieben, sodaß nach dieser Behandlung unter dem Mikroskop keine unzerstörten Zellen mehr wahrnehmbar waren. Dieser Brei zusammen mit dem defibrinierten Blut wurde mit 0,75 g Glycocoll und 1,22 g benzoesaurem Natron, welches in physiologischer Kochsalzlösung gelöst war, in einen Autoclaven gebracht, in welchem die Luft mit Sauerstoff verdrängt war, und 24 Stunden unter einem Druck von 10 bis 15 Atm. gehalten. Die Untersuchung ergab 0,07 g Hippursäure. Ein Durchblutungsversuch, in ähnlicher Weise gemacht, bestätigte den ersten Befund, und auch die Wiederholung beider Versuche ergaben das gleiche Resultat. Zur Kontrole für diese Versuche wurde gleichzeitig ein Teil des Nierenbreis und des Blutes ohne Zusatz von Glycocoll und Benzoesäure auf Hippursäure verarbeitet, nachdem es längere Zeit unter gleichen Bedingungen im Autoclaven verweilt hatte, jedoch keine Spur von Hippursäure erhalten. Auch wenn der mit Glycocoll und benzoesaurem Natron versetzte Brei von Blut und zerstampften Nieren bei 35 Grad 24 Stunden an der Luft stehen blieb, konnte keine Spur von Hippursäure nachgewiesen werden. Hieraus schließen die Verfasser, zumal das Nierengewebe eins der empfindlichsten im ganzen Organismus ist, daß dieses, wie ja auch der mikroskopische Befund ergeben, vollständig zerstört sei, die Synthese der Hippursäure also nicht als eine Funktion des Zelllebens angesehen werden könne. Auch der Einwand, das noch lebende Protoplasma vermöchte die Bil-

[1]) Hoppe-Seyler, Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. 35, Seite 324.

dung von Hippursäure veranlaßt haben, ist hinfällig, weil sonst der an der Luft stehen gelassene Brei von zerstampften Nieren und Blut Hippursäure hätte erzeugen müssen, was auch Bunge und Schmiedeberg nicht zu konstatieren vermochten. Es wäre nach meiner Ansicht ja immerhin nicht unmöglich, daß die Bildung der Hippursäure auf einem rein chemischen Wege sich vollzöge, aber nach der Arbeit von Brasford und Kramer scheint es mir denn doch nicht mit voller Bestimmtheit erwiesen zu sein, da sich geringe Mengen von Hippursäure immerhin gebildet haben können, und diese nach bisherigen Methoden nicht leicht nachweisbar sein dürften.

Woher stammt nun die Benzoesäure, die sich erst durch ihre Vereinigung mit dem Glycocoll zu Hippursäure umzubilden vermag? Tappeiner[1]) sagt in einer Arbeit über die Quelle der Hippursäure, daß zwar das Hauptreservoir derselben in der Nahrung zu suchen sei, falls diese überhaupt aromatische Stoffe enthält. Es vermag aber auch der Körper eines hungernden Hundes Hippursäure zu bilden, und daher kann man sie auch gewissermaßen als Stoffwechselprodukt tierischer Organe auffassen; ferner können auch die durch Fäulnis entstehenden aromatischen Säuren, so die Phenylpropionsäure durch Oxydation in Hippursäure übergeführt werden. Tappeiner fütterte Phenylpropionsäure und diese wurde tatsächlich als Hippursäure wieder ausgeschieden; Phenylessigsäure dagegen scheint ohne Einwirkung auf die Hippursäurebildung zu sein, da sie als Phenacetursäure wieder im Harn erscheint. Es wurde nun aus dem Panseninhalt mehrerer Rinder, die nur mit Heu ernährt waren, Phenylpropionsäure dargestellt (die Salkowsky vergebens im Tierkörper festzustellen versucht hat), und auch als solche durch Bildung ihres Silbersalzes und durch Schmelzpunktsbestimmung nachgewiesen. Hieraus erhält man den Beweis, daß im Verdauungskanal von Rindern bei Heufütterung Phenylpropionsäure gebildet werden muß, die zu Benzoesäure oxydiert wird, sich im weiteren Verlauf mit Glycocoll vereinigt und schließlich als Hippursäure zur Ausscheidung gelangt.

---

[1]) Zeitschrift für Biologie, Bd. 22, S. 236.

Nach Baumann[1]) soll die Bildung der Hippursäure lediglich von den Fäulnisprozessen im Darm abhängig sein, denn so bald die Darmfäulnis durch Gaben von Calomel unterbunden wurde, war die Hippursäure bereits vor den Ätherschwefelsäuren aus dem Harn verschwunden. Ich kann mich mit dieser Ansicht nicht einverstanden erklären; denn, wie aus meinen später zu erwähnenden Versuchen hervorgeht, wurde auch Hippursäure gebildet, wenn die ausgeschiedene Schwefelsäure rein oder doch fast rein anorganischer Natur war.

Es leuchtet sehr wohl ein, daß die aromatischen Spaltungsprodukte des Eiweißes Hippursäure zu bilden vermögen und hierbei kommt doch wohl in erster Linie das Tyrosin in Betracht. So hat auch Fröhde[2]) bei der Behandlung von Tyrosin mit Chromsäuregemisch neben Blausäure, Bittermandelöl, Ameisensäure, Essigsäure und Benzoesäure bekommen. Über das Verhalten des Tyrosins zur Hippursäurebildung hat K. Baas[3]) gearbeitet, ohne jedoch zu einem positiven Resultat zu kommen. Er war vor seinen Versuchen der Ansicht, daß Tyrosin resp. dessen Zersetzungsprodukte wie Phenol, Kresol, Oxyphenylessigsäure und Oxyphenylpropionsäure sehr wohl als eine Quelle zur Bildung der Hippursäure anzusprechen sei. Salkowsky ist der Versuch, durch Tyrosin eine Steigerung der Hippursäureausscheidung zu erzielen, auch einmal gelungen, bei jedem Wiederholungsfalle dagegen mißglückt. Er hält aber trotzdem an der Einwandsfreiheit seines ersten Versuches fest; Schotten und Baumann dagegeu haben keine Mehrausscheidung bei Verfütterung von Tyrosin konstatieren können. K. Baas machte 2 Versuche mit Tyrosin, bei deren ersten er 3 g verfütterte, beim zweiten 13 g; auch er konnte keine Erhöhung in der Hippursäureausscheidung feststellen. Da schon früher aus Eiweiß durch künstliche Oxydation Benzoesäure hergestellt ist, und ich selbst eine Methode gefunden habe, um die aus Eiweiß erhaltene Benzoesäure annähernd quantitativ zu bestimmen, kann ich mich nicht entschließen, die Versuche von K. Baas als einwandsfrei anzusehen, vielmehr möchte ich

[1]) Hoppe-Seyler, Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 10, S. 131.

[2]) J. 1860. 579, nach Beilstein.

[3]) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. XI. S. 485)

dazu bemerken, daß seine Untersuchungen sich beim ersten Versuch nur auf einen Tag, beim zweiten auch nur auf 2 Tage erstreckten, und daß bei letzterem am zweiten Tage eine deutliche Steigerung der ausgeschiedenen Hippursäure wahrzunehmen war. Ich halte erstens so kurze Versuche nicht für ausreichend, um über eine so wichtige Frage zu entscheiden, dann aber dürfte auch die Methode, nach welcher Baas die Hippursäure bestimmt hat, nach unseren neuesten Ergebnissen zu urteilen, keine sicheren Zahlen geben, selbst wenn es sich auch nur um Vergleichszahlen handelt. Wenn schon durch eine verhältnismäßig schwache künstliche Oxydation Benzoesäure aus Proteinsubstanzen dargestellt werden kann, wieviel näher liegt da die Wahrscheinlichkeit im Tierkörper, von dem wir nach neueren Untersuchungen von E. Schaer[1]) wissen, daß er Oxydationsfermente enthält, die so kräftig wirken, daß wir sie durch künstliche Oxydationsmittel kaum annähernd erreichen können. Eiweißkörper aber werden bekanntlich schon durch Oxydationsgemische, wie Braunstein oder Kaliumbichromat und Schwefelsäure verhältnismäßig leicht angegriffen. Die hierbei entstehenden Produkte wurden vorzugsweise von Guckelberger[2]) untersucht. Wird darnach ein T. trockner Eiweißsubstanz mit $3^1/_2$ T. concr. Schwefelsäure, 30 T. Wasser und 3 T. Braunstein in einer geräumigen Retorte erhitzt, so gehen bei guter Kühlung folgende Destilationsprodukte in die Vorlage: Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Baldriansäure, Capronsäure und auch Benzoesäure. Arbeitete er in derselben Weise mit einem Gemisch von einem T. Eiweiß, zwei T. Kaliumbichromat und $3^1/_2$ T. concr. Schwefelsäure mit 30 T. Wasser, so zeigte das Destillat einen betäubenden Geruch nach Blausäure und es finden sich in der Vorlage Propionaldehyd bezw. Aceton, Valeronitril, Bittermandelöl, Blausäure und Spuren von Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Benzoesäure und Capronsäure, daneben ein schweres wie Zimmtöl riechendes Öl, welches jedoch nicht weiter untersucht wurde. Die durch Oxydation von Eiweiß entstehenden Produkte sind also verhältnismäßig einfach zusammengesetzt und entstehen, wie bereits Liebig

[1]) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 37, S. 320.

[2]) Ann. Ch. Pharm., Bd. 64, S. 39, nach Fehling.

zeigte, sekundär aus den aus Eiweiß durch Hydratation zuerst gebildeten Substanz. Auch die Einwirkung von Chlor, Brom, Ozon und eines Gemisches von Salz- und Salpetersäure wurde untersucht, aber nichts neues dabei gefunden, denn die durch Behandlung mit Chlor und Brom entstehenden Produkte sind als Substitutions- oder Oxydationsprodukte der durch Hydratation der Eiweißkörper, wie Tyrosin, Leuzin etc. entstandenen aufzufassen. Selbst Leim, in welchem noch kein aromatischer Bestandteil nachgewiesen werden konnte, liefert bei der Oxydation Benzoesäure; was aber die übrigen Eiweißkörper betrifft, so kann die durch Oxydation derselben dargestellte Benzoesäure doch wohl nur aus den aromatischen Zerfallprodukten entstehen, und dieses ist vornehmlich Tyrosin.

Es wurde auch die Behauptung aufgestellt, daß Mandelsäure Hippursäure zu erzeugen vermöchte; C. Schotten[1]) dagegen weist nach, daß eingegebene Mandelsäure unzersetzt den tierischen Organismus passiert und im Harn als solche wieder abgesetzt wird. Er behauptet ferner, daß auch Amidophenylessigsäure im Organismus durch Austausch der Amidogruppe gegen die Hydroxylgruppe in Mandelsäure übergeht, die dann ebenfalls als solche den Organismus verläßt, entgegen den Versuchen von Schultzen und Gräbe[2]), die gefunden haben, daß Mandelsäure im Tierkörper in Hippursäure übergeht.

IV. Die Beschreibung der eigenen Untersuchungen.

a) Zu Grunde liegende Vorversuche.

Durch diese Übersicht über die in der Literatur bekanntesten Versuche läßt sich der Schluß ziehen, daß die meisten Stimmen dahin gehen, daß die Benzoesäure, die durch Zusammentritt mit dem Glycocoll die Hippursäure bildet, aus aromatischen Produkten entsteht, die durch die Nahrung dem Körper zugeführt werden, und sich vielleicht auch zu einem ganz geringen Teile aus den Zerfallprodukten des Organismus, die aromatischer Natur sind,

[1]) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. Physiologie, Bd. VIII, S. 60.

[2]) Ann. d. Chem. n. Pharm,. Bd. 142, S. 349.

ableiten läßt. Es ist aber, wie schon erwähnt, trotz zahlreichster Versuche noch nicht gelungen, irgend welche aromatischen Körper zu isolieren, wenngleich diese und jene Mutmaßungen vorliegen.

Um also nochmals einen Versuch zu machen, der Entscheidung dieser Frage einen Schritt näher zu kommen, nahmen Th. Pfeiffer und seine Mitarbeiter[1]) dieselbe vor nunmehr 3 Jahren wieder auf. Es war uns aber von vornherein sehr wahrscheinlich, daß die bisher bekannten Methoden nicht genau genug waren, um der Sache auf den Grund zu kommen, daß aber durch Auffindung und Aufstellung einer neuen Methode die Hippursäurefrage in eine ganz neue Phase rücken würde, war nicht ohne weiteres vorauszusehen. Von den vielen Methoden zur »quantitativen« Bestimmung der Hippursäure kam für Versuche, wie wir sie vorhatten, mindestens 4 Bestimmungen pro Tag, überhaupt nur eine einzige in Betracht, und zwar die alte Methode von Henneberg[2]), die bisher neben Einfachheit in der Handhabung auch ganz leidliche Resultate geliefert hatte. 200 cc des alkalischen Harns werden auf dem Wasserbade bis auf etwa 50 cc eingedampft, und die Hippursäure mit 20 cc einer mäßig konzentrierten Salzsäure ausgefällt. Man läßt nun längere Zeit, etwa 48 Stunden, im Eisschrank stehen, bringt die Hippursäure auf ein gewogenes Filter, wäscht mit kaltem Wasser so lange aus, bis das Waschwasser farblos abläuft und bringt die bei 100° getrocknete Hippursäure zur Wägung. Das Volumen des Filtrats mitsamt dem Waschwasser und dem aus dem Niederschlage durch Pressen zu entfernenden Wassers wird ermittelt, und nach dem Löslichkeitsverhältnis der Hippursäure in kaltem Wasser (1 : 600) eine Korrektur an dem gewogenen Quantum angebracht, so, daß für je 6 ccm Filtrat immer 10 mg Hippursäure zu der gefundenen Menge hinzuaddiert werden.

Jedoch schon an dem dunkel gefärbten Niederschlage erkennt man, daß durchaus keine reine Hippursäure zur Wägung gebracht wird, wie viel reine Hippursäure aber dieses Fällungsprodukt wirklich enthält, ist bisher niemals festgestellt worden, weil eben

[1]) Mitteil. d. landw. Inst. d. Univ. Breslau II, S. 273.

[2]) Beiträge zur rationellen Fütterung der Wiederkäuer.

die Methode dazu fehlte. Auch die Bestimmung des Lösungskoeffizienten leidet an dem Übelstande, daß das Waschwasser sicher nicht lange genug mit der Hippursäure in Berührung bleibt, um sich mit dieser zu sättigen, infolge dessen also zu hohe Zahlen resultieren, die unter Umständen große Fehler bedingen. Die andere Methode, die wohl im wesentlichen von Physiologen benutzt ist, stammt von Bunge und Schmiedeberg[1]), ist aber viel umständlicher und erweist sich für eine täglich auszuführende Zahl von 4 Analysen unter normalen Verhältnissen als unmöglich. Ursprünglich hat wohl dieses Verfahren zur Abscheidung geringer Mengen Hippursäure in reinem Zustande aus tierischen Geweben oder Flüssigkeiten gedient und ist auch ohne Zweifel für solche Untersuchungen sehr zweckentsprechend gewesen. Aber schon bei der Ausschüttelung reiner wässeriger Lösungen mit Essigäther wurden im günstigsten Falle nur 97,4 % der angewandten Hippursäure wiedergefunden. Trotzdem wurde dann aber die Methode auch auf die Untersuchung von Harn übertragen und die betreffende Vorschrift lautet hierfür folgendermaßen[2]): »Die nicht zu kleine Quantität Harn, vom menschlichen Harn mindestens 100 ccm, wird mit Sodalösung alkalisch gemacht, filtriert und das Filtrat zu dickem Syrup eingedampft, der Rückstand wiederholt mit kaltem Alkohol ausgezogen, vom filtrierten Auszuge der Alkohol abdestilliert, und der Rest durch Abdampfen verjagt, die rückständigen Massen mit Salzsäure versetzt und wiederholt (mindestens 5 mal) mit neuen Portionen Essigäther ausgeschüttelt; die klar abgegossene Lösung der Hippursäure im Essigäther wird mit Wasser gewaschen und dann bei mäßiger Temperatur verdunstet. Der Rückstand wird mit frisch destilliertem Petroläther nochmals ausgezogen, um Benzoesäure und andere Verunreinigungen zu entfernen, in wässriger Lösung mit etwas Tierkohle digeriert, filtriert, bei höchstens 50—60° zur Kristallisation verdunstet, getrocknet und gewogen.«

Aus dieser Beschreibung erhellt wohl hinlänglich, daß diese Methode außerordentlich umständlich und zeitraubend ist, aber

[1]) Archiv für experimentelle Pathologie, Bd. 6 (1877), S. 233.

[2]) Hoppe-Seyler, Handbuch der physiol. chem. Analyse.

auch sonst treten gleich von vornherein einige starke Bedenken gegen die Methode auf. Diese sind jedoch mit genügender Klarheit bereits in einer früheren Arbeit[1]), an der ich beteiligt war, ausgesprochen, sodaß ich wohl hierauf verweisen kann.

Modifikationen, die wir an der Bunge-Schmiedeberg'schen Methode anzubringen versuchten, sind sämtlich gescheitert, weil es uns nicht gelang, bestimmte undefinierbare Stoffe von der Hippursäure zu trennen und diese zu isolieren. Von den übrigen Methoden ist ja auch in der oben zitierten Arbeit das Nötige gesagt, sodaß ich nunmehr zu einer ganz kurzen Besprechung unserer neuen Methode übergehen kann, die wir allerdings erst nach zahllosen vergeblichen Versuchen aufzufinden vermochten, ebenso wie auch den allerwahrscheinlichsten Grund, um dessentwillen die bisher gebräuchlichen Methoden sich als undurchführbar erwiesen haben. Es ließ sich nämlich auf keinem Wege des Analysenganges vermeiden, daß einerseits nicht eine Menge sehr verschiedenartiger, aber unbekannter Substanzen mit in die abgeschiedene Hippursäure gelangten, andererseits aber auch überhaupt das Ausfallen der Hippursäure hinderten, sodaß erstens das Endprodukt der zu wägenden Substanz stark verunreinigt war, zweitens überhaupt nicht sämtliche Hippursäure zur Abscheidung gelangte. Zu welchen Irrtümern eine derartige Kompensation führen kann, wird noch im Laufe dieser Arbeit klar werden. Es handelt sich hier offenbar um Stoffe von einem ausgesprochen colloidalen Charakter, und wir haben uns deshalb bei der Prüfung unserer neuen Methode nicht allein darauf beschränkt, zu konstatieren, daß sich bei Bestimmung der Hippursäure in reinen Substanzen und im Harn je untereinander übereinstimmende Resultate ergaben, sondern wir untersuchten den Harn einerseits für sich, andererseits mit Zusätzen von reiner Hippursäure in verschiedenen Mengen, und konstatierten so, ob wir auch die jeweiligen Zusätze zum Harn quantitativ wiederfanden. Die Methode beruht auf der Zersetzbarkeit der Hippursäure in ihre beiden Komponenten, die Benzoesäure und Amidoessigsäure, durch Kochen mit starken Mineralsäuren. Kocht

[1]) Mitteilungen d. landw. Inst. d. Univ. Breslau II, S. 275.

man also z. B. reine Hippursäure mit etwa 40—50 prozentiger Schwefelsäure unter fortwährendem Ersatz des entweichenden Wassers, so tritt die Spaltung der Hippursäure sehr bald ein und die Benzoesäure, die mit Wasserdämpfen flüchtig ist, kann durch direkte Titration im Destillat bestimmt werden. Schon die ersten in dieser Art gemachten Versuche lieferten befriedigende Resultate. Selbstverständlich haben wir uns vorher überzeugt, daß die für die Bestimmungen benutzte Hippursäure rein war, und die Fabrik von Grübler in Dresden-Plauen lieferte uns solche, deren Bestimmung im Mittel 0,9986 g bei Anwendung von 1,0000 g ergab. Wie wohl begreiflich, ist es zuweilen nicht zu umgehen, daß Spuren von Schwefelsäure durch die Wasserdämpfe mitgerissen werden, und da wir bald sahen, daß eine direkte Titration der übergehenden Benzoesäure im Harn unmöglich war, mußten wir zu einer indirekten Bestimmung greifen. Das neutralisierte Destillat wurde demnach eingedampft und in ein mit einer Marke versehenes, 50 ccm fassendes, gekröpftes Kölbchen übergespült, nach dem Abkühlen bis zur Marke aufgefüllt und aus einer Nachlaufpipette, die von einer Marke zur anderen genau 10 ccm faßt, 10 ccm einer titrierten Säure zugesetzt, deren Gehalt durch Einstellen gegen eine andere Säure auf das genaueste bestimmt war, die hinwiederum mit Hilfe der Gewichtsanalyse, reinster Bernsteinsäure und reinstem Natriumcarbonat auf ihren Gehalt untersucht war. Zu diesem indirekten Verfahren waren wir deshalb gezwungen, weil zugleich mit der Benzoesäure auch die flüchtigen Fettsäuren des Harns, sowie die aus den Chloriden in Freiheit gesetzte Salzsäure und die abgespaltene Kohlensäure mit überdestillieren. Nachdem nun die Kölbchen in dieser Art beschickt und die Flüssigkeitsgemische durch kräftiges Schütteln gut verteilt sind, stellt man die Fläschchen 48 Stunden in einen Eisschrank, und hierauf erfolgt nach dem Ablesen der im Eisschrank herrschenden Temperatur die Filtration im Eisschrank durch ein kleines trocknes Faltenfilter in ein trocknes Gefäß. Von dem auf Zimmertemperatur gebrachten Volumen titriert man aliquote Teile mit Natronlauge von bekanntem Gehalte unter Benutzung von Phenolphatalein als Indikator. Die Schwefelsäure, die zum Ausfällen der Benzoesäure benutzt wurde, war so her-

gestellt, daß 10 ccm derselben einer bestimmten Menge titrierter Natronlauge entsprachen, beispielsweise 10 cc H_2SO_4 = 47,04 cc Natronlauge; so ergab sich für 1 cc Lauge = 0,0410 g Hippursäure. Würden nun etwa in einem speziellen Falle 23,25 Lauge verbraucht, so müßte noch $^1/_5$ derselben hinzugezählt werden, da doch von 60 cc Flüssigkeit nur 50 cc angewandt wurden, und das würde in unserem Falle demnach 27,90 cc Lauge ergeben. Die zur neutralen Benzoesäurelösung zugesetzten 10 ccm Schwefelsäure entsprachen, wie erwähnt, 47,04 ccm Lauge; die Differenz von 47,04 minus 27,90 = 19,14 ccm ist dadurch entstanden, daß eine entsprechende Menge Benzoesäure aus der Flüssigkeit im unlöslichen Zustand abgeschieden und abfiltriert worden ist. Multipliert man daher die berechneten 19,14 ccm mit dem oben angegebenen Faktor 0,041, so erfährt man diejenige Hippursäuremenge, die der abgeschiedenen Benzoesäuremenge entspricht, im vorliegenden Falle also 0,7847 g. Es muß nun natürlich noch eine Korrektur für die in Lösung bleibende Benzoesäure, ebenfalls auf Hippursäure umgerechnet, angebracht werden, selbstverständlich unter Berücksichtigung der jeweiligen Temperatur im Eisschrank. Zu unserer eigenen Bequemlichkeit haben wir uns eine Tabelle[1]) aufgestellt, deren Zahlen vielleicht nicht absolut genau der Wirklichkeit entsprechen, wobei jedoch sicherlich kein praktisch irgendwie nennenswerter Fehler entstanden ist. Ich werde an späterer Stelle bei Zusammenstellung der Tabellen für meine Versuchsreihen zur besseren Übersicht diese Tabelle niederschreiben.

Es mußte nun ferner auch ausprobiert werden, wie lange die Destillation der Benzoesäure bis zum quantitativen Verlauf der Reaktion fortzusetzen war. Wir bemerkten denn auch sehr bald, daß bei der Destillation von 100 cc Harn, die nicht erheblich mehr als 1,0 g Benzoesäure zu liefern vermochten 300 ccm Destillat vollkommen genügten, um die Benzoesäure quantitativ überzudestillieren. Ferner ist noch beachtenswert, daß der Harn von Hammeln erstens durch die Zerstörung des Harnstoffs, dann aber auch wegen seiner verhältnismäßig hohen Alkalität nicht

[1]) l. c. S. 284.

unerhebliche Mengen von Kohlensäure liefert, mit der sich das Destillat sättigt, und die dann bei der Neutralisation mit Natronlauge ziemlich reichliche Mengen Karbonat liefert, welches jedoch beim Eindampfen unter Abspaltung von CO_2 in Dinatriumkarbonat übergeht, wodurch dann die Flüssigkeit vom zugesetzten Indikator wieder stark rot gefärbt wird. Die Neutralisation des Dinatriumkarbonats ist aber ziemlich umständlich und man tut daher gut, vor der Neutralisation durch das Destillat $^1/_2$ bis 1 Stunde einen continuierlichen Wasserstoffstrom gehen zu lassen, wodurch die Kohlensäure fast quantitativ ausgetrieben und die Neutralisation sehr vereinfacht wird.

Nachdem durch zahlreiche Versuche die absolute Richtigkeit unserer Methode sicher gestellt war, gingen wir daran, nunmehr die Methode von Bunge-Schmiedeberg und die von Henneberg mit der unseren zu vergleichen. Wie aus der schon mehrfach erwähnten Arbeit, die ich zum besseren Verständnis der meinigen hier zum größten Teile referieren muß, hervorgeht, lieferten beide Methoden viel zu niedrige Ergebnisse, jedoch nicht allein das; auch die Untersuchung des Fällungsproduktes nach der Henneberg'schen Methode und die nach der Bunge-Schmiedeberg'schen zur Wägung gebrachte Hippursäure ergaben beide, daß sie keineswegs reine Hippursäure darstellten, sonden stark mit anderen, allerdings undefinierbaren Substanzen verunreinigt waren. Es entsteht etwa folgendes Bild:

		200 ccm	Harn	enth.	Hippursäure	g
	a	b	c	d	e	Mittel
I. Reihe	Neue Methode (100 cc × 2)	1,7496	1,7520	1,7496	1,7226	1,7594	1,7466
	Henneberg, unkorrigiert	1,0320	1,0529	1,0373	1,0658	—	—
	„ korrigiert	1,1570	1,1779	1,1623	1,1908	—	1,1720
	Bunge-Schmiedeberg	1,2213	1,0612	1,1830	1,1913	—	1,1642
II. Reihe	Neue Methode (100 cc × 2)	1,8504	1,8711	1,8948	1,8726	–	1,8722
	Henneberg, korrigiert	1,2947	1,2882	1,3272	1,2723	—	1,2906
	Bunge-Schmiedeberg	1,3734	1,3145	1,2584	—	—	1,2366

Diese unreine Hippursäure enthielt reine Hippursäure:

			a	b	c	d	Mittel
I. Reihe	Henneberg	g	0,9246	0,9291	0,9192	0,8803	—
		%[1]	89,59	88,24	88,61	82,60	87,26
	Bunge-Schmiedeberg	g	0,8325	0,7439	0,8950	0,8412	—
		%	68,16	70,10	75,66	70,61	71,13

Die absoluten Prozentzahlen ergeben demnach folgende Werte:
Nach Henneberg:

$$\frac{1{,}1720 \times 87{,}26}{100} = 1{,}0227 \text{ g statt } 1{,}7466 \text{ g} = 58{,}6\ \%.$$

Nach Bunge-Schmiedeberg:

$$\frac{1{,}1642 \times 71{,}13}{100} = 0{,}8281 \text{ g statt } 1{,}7466 \text{ g} = 47{,}4\ \%.$$

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die weiteren Kontrollversuche, was jedoch W. v. Schroeder[2]) nicht hinderte, die an Hammel verfütterte Benzoesäure fast quantitativ als Hippursäure wiederzufinden. Weiske[3]) hat denn ja auch später konstatiert, daß überhaupt nicht sämtliche verfütterte Benzoesäure im tierischen Organismus in Hippursäure übergeführt zu werden vermag.

Wenn unsere Methode nun aber auch den großen Vorzug besitzt, eine absolut genau quantitative Bestimmung der im Harn ausgeschiedenen Hippursäure zu liefern, so ist doch auf der anderen Seite der Übelstand nicht zu verkennen, daß keine Trennung der Hippursäure von etwa mit ausgeschiedener Benzoesäure möglich ist. Für die Beantwortung der Frage nach der Muttersubstanz der Hippursäure ist etwa mit ausgeschiedene Benzoesäure ohne Belang, für andere Zwecke könnte aber eine Trennung sehr wünschenswert erscheinen. Ein Ausschütteln des Harns mit Petroläther vor der Destillation mit Schwefelsäure würde zwar einen Teil der Benzoesäure zu extrahieren gestatten, aber nach unseren früheren Versuchen dieses quantitativ zu er-

[1]) Die Prozentzahlen mussten natürlich auf die obigen unkorrigierten Zahlen bezogen werden, da nur die diesen entsprechende Menge Hippursäure zur Verfügung stand.

[2]) Hoppe-Beyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 3, 1897, S. 326.

[3]) Zeitschr. f. Biologie Bd. 12, S. 212.

reichen, sind wir weit vom Ziele geblieben, da wir nach zehnmaligem Schütteln im Schüttelapparat (jedesmal $^1/_4$ Stunde bis 20 Minuten Schüttelzeit) nur ungefähr 60 bis 70 % der zugesetzten Benzoesäure wiederfanden. Und daß die Benzoesäure auch in fester Form gar nicht so sehr leicht in Petroläther löslich ist, geht daraus hervor, daß wir, um 1 g reine Benzoesäure im Soxhlet-Apparate zu extrahieren, 32 Stunden brauchten; dann allerdings war die Extraktion quantitativ. Übrigens habe ich die Probe oft genug gemacht, daß in normalem Harn keine Benzoesäure als solche vorkommt. Jedoch tut man gut, immer möglichst frischen Harn zu verarbeiten, da nach Boussingault auch im normalen Harn ein Ferment enthalten sein soll, welches die Hippursäure in Benzoesäure und Glycocoll spaltet. Für unsere Methode allerdings erweist sich eine derartige Vorsicht als überflüssig, da wir ja die Benzoesäure bestimmen. nach der Bunge-Schmiedeberg'schen und Henneberg'schen Bestimmungsart würden die ohnehin schon sehr großen Fehlerquellen durch ein falsches Wiegen noch erhöht werden, zumal wenn man, wie es Bunge und Schmiedeberg vorschreiben, auch noch die Extraktion mit Petroläther vornimmt. Eine Bemerkung ist betreffs unserer Methode noch zu machen. Wie aus unserer schon mehrfach zitierten Arbeit hervorgeht, ist es ratsam, um die Anbringung eines Korrektionsfaktors jeder einzelnen Analyse zu vermeiden, wenngleich derselbe absolut keinen irgendwie ins Gewicht fallenden Fehler bedingt, die Abmessung des für die Analyse nötigen Harns so zu bemessen, daß die betreffende Harnmenge nicht wesentlich über 1,0 g Hippursäure enthält, weil man die Mengen mit 250 bis 300 cc Destillat bequem quantitativ überdestillieren kann, und ein Vorversuch genügt ja, um sich zu überzeugen, wie viel Harn man anzuwenden hat.

Wenn wir jetzt mit unserer neuen Methode Tierversuche machen wollten, mußten wir der Sicherheit wegen zunächst noch einmal prüfen, welche Resultate wir erzielten, wenn wir analog früheren Versuchen von Henneberg und anderen Forschern Kohlenhydrate einerseits, reines Eiweiß andererseits zu einer schon vorher angewandten Grundfutteration zulegten. Denn bisher hatte allgemein die Ansicht festgestanden, daß Kohlenhydrate oder schärfer

ausgedrückt Hexosen die Hippursäureausscheidung herabsetzen. Diese Erscheinung wurde dadurch erklärt, daß, wie aus vielen Beobachtungen hervorging, einerseits durch eine Beigabe von Kohlenhydraten zum ursprünglichen Futter die Eiweißfäulnis herabgesetzt, andererseits auch verminderte Verdaulichkeit der Hippursäure-Muttersubstanz durch Beigabe leichtverdaulicher Nährstoffe bedingt wurde, und als Maßstab für die Beurteilung der ersterwähnten Erscheinung dient in neuerer Zeit die Bestimmung der Ätherschwefelsäuren nach Baumann-Morax.[1]) Bei der Eiweißfäulnis im Darme entstehen nämlich u. a. Phenole, als deren Muttersubstanz nach Hammersten[2]) das Tyrosin zu betrachten ist, daneben aber auch noch das Skatol und das Indol. Die beiden letztgenannten Stoffe werden zunächst zu Skatoxyl resp. zu Indoxyl oxydiert und gehen nach einer Paarung mit Schwefelsäure als Ätherschwefelsäure in den Harn über. Die wichtigsten Ätherschwefelsäuren sind Phenol-, Kresol-, Skatoxyl- und Indoxylschwefelsäure. Baumann[3]), der sie auch entdeckt hat, hat sie näher studiert, und andere Forscher wie A. Hirschler[4]) und G. Gottwald[5]) konnten konstatieren, daß Rohrzucker, Stärke und auch Glycerin die Darmfäulnis herabzusetzen vermögen. Aus dem sehr plausiblen Grunde, daß, abgesehen von den erwähnten, auch noch eine große Reihe anderer Versuche das gleiche Resultat ergeben hatten, unterblieb bei unseren ersten Versuchen, die noch nicht veröffentlicht sind, demnächst aber in den Mitteilungen der landwirtschaftlichen Institute der Universität Breslau erscheinen werden, die Bestimmung der Ätherschwefelsäure. Meine eigenen späteren Versuche dagegen haben ergeben, daß diese Unterlassungssünde an dem Gesamtresultat nichts geändert hätte. Da ich, wie gesagt, später die Ätherschwefelsäure mitbestimmt habe, dürfte es vielleicht an dieser Stelle nicht unangebracht sein, auch die Methode kurz zu erwähnen, nach der die Bestimmungen gemacht werden. Da ich die Methode von Salkowsky[6]) für sehr geeignet

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 10, S. 315.
[2]) Hammersten, Lehrbuch der physiol. Chemie 1895, S. 441.
[3]) Archiv für die ges. Physiologie Bd. 12 u. 13.
[4]) Zeitschr. für physiol. Chemie Bd 10, S. 315.
[5]) Journ. f. Landw. Bd. 36, S. 333.
[6]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 10 S. 346 u. Archiv f. pathol. Anat. Bd. 79, S. 551 (1870) nach Hoppe-Seyler-Thierfelder chemische Analyse (1903) S. 422.

halte, weil ihre Ausführung verhältnismäßig einfach und bequem ist, habe ich nach dieser gearbeitet. In einer Harnportion wird die Gesamtschwefelsäure, in einer anderen die Ätherschwefelsäure ermittelt und aus der Differenz beider die als anorganisches Salz vorhandene Sulfatschwefelsäure bestimmt:

I. Gesamtschwefelsäure. 100 cc verdünnter oder, wenn unnötig, unverdünnter Harn, der kein Eiweiß enthalten darf, werden mit 10 cc Salzsäure von 1,12 spez. Gew. vom beginnenden Sieden an gerechnet 15 Minuten auf einem Drahtnetz gekocht, dann mit Baryumchloridlösung im Überschuß versetzt und bei kleiner Flamme bis zum vollständigen Absitzen des Niederschlages digeriert. Der Niederschlag wird durch ein aschefreies Filter filtriert, mit heißem Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und im gewogenen Platintiegel verbrannt, nach Zufügung einiger Tropfen Schwefelsäure geglüht und gewogen. Die gewogene Menge Baryumsulfat rechnet man nach vorliegenden Tabellen auf Schwefelsäure um.

II. Ätherschwefelsäure. 100 cc desselben Harns werden mit dem gleichen Volumen einer Barytmischung (2 Vol. kaltgesättigtes Barytwasser und 1 Vol. kaltgesättigte Chlorbaryumlösung) in einem trocknen Erlenmeyer-Kolben unter tüchtigem Schütteln gemischt und nach einigem Stehen durch ein trocknes Faltenfilter in ein trocknes Gefäß filtriert. 160 cc des Filtrats, entsprechend 80 cc Harn, neutralisiert man nun mit Salzsäure, fügt dann noch 15 cc Salzsäure vom spez. Gew. 1,12 hinzu und verfährt wie nach I, doch ohne Hinzufügung von Baryumchloridlösung. Die für die Bestimmung anzuwendende Menge Harn ist natürlich willkürlich; ich habe immer 50 cc des auf ein bestimmtes Volumen aufgefülltem Harns zur Bestimmung der Gesamtschwefelsäure und 75/75 cc Harn resp. Baryumchloridgemisch entsprechend 50 cc Harn der Einfachheit der Berechnung wegen zur Bestimmung der Ätherschwefelsäure angewandt.

Weil es uns nicht unmöglich erschien, daß die Alkaleszenz des Harnes in irgend welcher Beziehung zur Bildung der Hippursäure stehen könnte, lag es nahe, daß wir uns entschlossen, dieser Vermutung auf den Grund zu kommen. Tatsache ist z. B., daß bei Fütterung von Kleeheu die Alkaleszenz erheblich steigt, während

Hippursäure nur in ganz geringen Mengen zur Abscheidung gelangt. Es wäre also nicht undenkbar, daß Futtermittel, welche eine starke Carbonatbildung im Harn bedingen, andererseits wenig Hippursäure zu bilden vermögen. Zur Bestimmung der Alkaleszenz des Harnes wandten wir eine verhältnismäßig einfache Methode an, die aber mit einer anderen sicheren, doch viel umständlicheren geprüft, sehr gut übereinstimmende Resultate ergab. Je nach der Höhe der Alkalenszenz des Harnes werden 100 bis 200 cc desselben in einem Erlenmeyerkolben mit 10 cc einer genügend konzentrierten Baryumchloridlösung versetzt und dadurch die löslichen Alkalicarbonate in das unlösliche Baryumcarbonat übergeführt. Nachdem dieses genügend lange mit kaltem Wasser ausgewaschen ist, — (kaltes Wasser ist unbedingt zur Verringerung eines unvermeidlichen kleinen Fehlers anzuwenden, da Baryumcarbonat selbst in kaltem Wasser nicht absolut unlöslich ist, Löslichkeit etwa 1 : 20000) — wird der Niederschlag samt Filter in den ursprünglichen Erlenmeyer zurückgegeben, mit etwa 100 bis 200 cc destilliertem Wasser versetzt, 25 cc einer Schwefelsäure von bekanntem Gehalt hinzugefügt und zur Austreibung der Kohlensäure einige Zeit gekocht. Die überschüssige Schwefelsäure wird mit Natronlauge zurücktitriert und aus der Differenz die Kohlensäure berechnet. Im Laufe der Versuche jedoch stellte es sich heraus, daß erstens die Alkaleszenz des Harnes ziemlich bedeutenden Schwankungen unterworfen, ferner aber, daß sie ohne jeglichen Einfluß auf die Hippursäureausscheidung ist, weshalb ich wohl auf die Angabe der Versuchsergebnisse verzichten kann.

Wie bereits erwähnt, sollten unsere ersten Versuche[1]) nur eigentlich Tastversuche sein, bezw. eine Kontrolle für die zahlreichen schon früher gemachten. Wir gingen daher von einem normalen Grundfutter aus, welches auch während der ganzen Dauer der Versuche gegeben wurde. Nach einer sechstägigen Vorfütterung, die ja aus bekannten Gründen für Wiederkäuer notwendig ist, wurde der Harn während einer Dauer von weiteren 6 Tagen untersucht, damit wir sehen konnten, ob der Tierkörper

[1]) Noch nicht veröffentlichte Versuche von Th. Pfeiffer, C. Bloch und R. Riecke.

sich auch normal auf die Futterration eingestellt hatte. Wir arbeiteten mit 4 Tieren, um die Gewißheit zu haben, daß uns individuelle Eigenschaften nicht etwa die Versuche störten. Die Tiere waren gleich alt, gleichgross, hatten etwa gleiche Körperbeschaffenheit und annähernd das gleiche Gewicht. Nachdem also in der Normalfutterperiode 700 g Wiesenheu, 50 g Weizenschalen und 10 g Kochsalz für jedes der vier Tiere zur Verfütterung gelangt waren, wurden in der darauf folgenden Periode, wieder mit einer sechstägigen Vorfütterung, während welcher die Untersuchungen unterbrochen wurden, zu dieser Grundfutterration für jedes Tier 150 g reine Stärke zugelegt, um zu sehen, ob Kohlenhydrate wirklich deprimierend auf die Hippursäureausscheidung wirkten. Obwohl die Tiere nach ungefähr 8 Tagen anfingen, einen leichten Durchfall zu bekommen, wurde die Periode, zumal sich dieser auch nach ganz kurzer Zeit legte, auf 14 Tage, von denen 8 Versuchstage mit Untersuchung waren, ausgedehnt.

Wie aus der folgenden Tabelle, welche die Zahlenreihen der ersten Grundfutter- und der zweiten Stärkeperiode enthält, ersichtlich sein dürfte, war das Ergebnis der Hippursäureausscheidung ein ganz anderes, als wie es nach den bisherigen Erfahrungen zu erwarten war. Denn obwohl durch die Zulage der Stärke, wie aus dem Vergleich der Stickstoffausscheidung während der beiden Perioden hervorgeht, ein deutlicher Ansatz von Eiweiß stattfand, blieb die ausgeschiedene Hippursäuremenge während beider Perioden gleich. Die Stärke hatte also, wie zu erwarten war, eiweißsparend gewirkt, es waren somit weniger Proteinsubstanzen dem Zerfall im Tierkörper anheimgefallen; eine Quelle der Hippursäure, die Zerfallprodukte der aromatischen Gruppen des Eiweißes blieb also teilweise verschlossen. Trotzdem aber hat sich die Ausscheidung der Hippursäure nicht erheblich vermindert, infolgedessen können auch die aromatischen Abbauprodukte des Eiweißes nur eine verhältnismäßig geringe Rolle bei der Bildung der Hippursäure spielen. Vielmehr ist anzunehmen, daß eine andere Substanz die Muttersubstanz der Hippursäure bildet.

Die Versuchseinrichtung war die allgemein übliche; die vier Hammel befanden sich in sogn. Zwangsställen, sodaß es gestattet

war, den Harn und nötigenfalls auch den Kot quantitativ zu entnehmen. Der Harn wurde durch den mit einem Schlauch verbundenen Harntrichter in die darunterstehende Flasche geleitet, in der sich etwas Carbolsäure befand, die, besonders im Sommer, den Harn vor allzu schneller Zersetzung schützen sollte. Ebenso wurde auch der Harntrichter täglich mit einer Carbolwasserlösung gründlich ausgespritzt. Immer nach 24 Stunden, morgens 8 Uhr, wurde der Harn entnommen und sofort eine neue Flasche unter Anwendung derselben Vorsichtsmaßregeln untergestellt. Die Fütterung der Versuchstiere fand täglich dreimal, morgens um 8 Uhr, mittags um 12 Uhr und nachmittags um 5 Uhr statt, weil wir merkten, daß sie viel sauberer ihre Krippen leerten, als bei zweimaliger Fütterung; denn unter normalen Verhältnissen waren niemals auch nur die geringsten Futterreste zu verzeichnen gewesen. Da unsere Stallungen sehr günstig mit der Fensterseite nach Norden gelegen sind, stieg die Temperatur auch in den heißesten Tagen nicht über 16° R., sodaß man annehmen durfte, daß die Tiere trotz ihrer vielleicht nicht gerade bequemen Stellung in den Zwangsställen wegen der Geschirre keine Not litten, also der Körperzustand absolut normal war. So sind wohl auch die kleinen Unterschiede, die an den einzelnen Tagen sowohl, wie besonders beim Vergleich der Tiere untereinander vorkommen, als so unwesentlich auf das Gesamtergebnis anzusehen, daß man sie lediglich den individuellen Verschiedenheiten der Tiere untereinander zuschreiben kann. Während der Grundperiode bewegen sich die Zahlen in den unvermeidlichen Fehlergrenzen. Da der Harn bei sämtlichen Perioden immer auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt wurde, und da dann für jede einzelne Analyse aliquote Teile entnommen wurden, ist es wohl überflüssig, die ausgeschiedenen Mengen einzeln anzugeben. Ich will nur bemerken, daß die Wasseraufnahme eine ziemlich regelmäßige bei sämtlichen Versuchstieren war, und daß es infolgedessen nicht wunderbar ist, wenn auch die Harnabscheidung eine durchaus gleichmäßige war. Die ausgeschiedene Hippursäure erreicht in der Normalperiode eine mäßige Höhe, denn V. Hofmeister[1]) hat bei Wiesenheufütterung bis zu 30 g

[1]) J. 1873, S. 982 nach Beilstein.

täglich pro Stück gefunden. Das erklärt sich aber wohl daraus, daß das verfütterte Wiesenheu ziemlich reich mit Klee vermischt war. Immerhin ist die Ausscheidung aber groß genug, um Differenzen, wie sie durch Verfütterung von Kohlenhydraten früher erzielt waren, erkennen zu können. Die Mittelzahlen der zweiten Periode, während welcher also die Hammel zu ihrer Grundfutterration pro Stück 150 g Stärke erhielten, weichen von der Ausscheidung der einzelnen Tage so unerheblich ab, daß man sich sehr gut ein Bild von dem Versuche machen kann. Während sich bei Hammel II, III und IV tatsächlich ein ganz schwaches Sinken der Hippursäureausscheidung bemerkbar macht ist bei Hammel I eine ganz minimale Steigerung derselben zu beobachten. Diese Beobachtung ist natürlich ohne jegliche Bedeutung, denn Stärke dürfte wohl kaum Substanzen enthalten, welche zu einer Mehrbildung von Hippursäure beitragen könnten. Diese Mehrausscheidung erklärt sich aber vielleicht aus der Unregelmäßigkeit der Versuchsergebnisse des zweiten und dritten Tages. Am zweiten Tage trat tatsächlich ein gar nicht so unerhebliches Sinken der Hippursäureproduktion ein, sie sank von 12,22 auf 11,03 g. Dafür aber stieg am dritten Tage die Hippursäure auf 15,05 g, jedoch diese Unregelmäßigkeit bedingt nicht, daß die Mittelzahl aller Versuchstage eine Kleinigkeit höher liegt, als die der Normalfutterperiode. Bei den drei übrigen Hammeln ist ein Rückgang in der Hippursäureausscheidung von 0,74 bis 1,38 g pro Tag bemerkbar, und dieser Rückgang findet darin seine einfachste Erklärung, daß durch die Stärkezulage an Eiweiß gespart ist, infolgedessen das angesetzte Eiweiß nicht dem Verfall anheimfallen konnte und daher auch weniger aromatische Abbauprodukte der Proteinsubstanzen entstanden, aus denen durch ihre Oxydation im Tierkörper zu Benzoesäure Hippursäure hätte gebildet werden können. Wie ist nun aber dieser schroffe Gegensatz zu früheren Versuchen zu erklären? Die Antwort darauf ist, daß die Methoden, nach denen man früher arbeitete, mit so großen Versuchsfehlern behaftet gewesen sein müssen, daß ein derartiger Irrtum möglich war, trotzdem die Kontrollbestimmungen untereinander gutstimmende Resultate lieferten. Beobachtet man den Harn, den die Hammel nach einer so intensiven Fütterung

mit Stärke liefern, so sieht man schon äußerlich Unterschiede zwischen diesem und dem durch ein normales Wiesenheu-Futter erzeugten Harn. Letzterer ist selbstverständlich auch nur in frischem Zustande blank und klar, der Harn nach Stärkefütterung dagegen von vornherein trübe und von schleimiger Beschaffenheit. Wir erklären uns daher unsere letzten Resultate so, daß unsere Methode gestattet, unbeachtet der colloidalen Substanzen, welche die quantitative Abscheidung der Hippursäure als solche in jeglicher Form hindern, trotzdem richtige Ergebnisse zu erzielen, da wir ja durch die Destillation der aus Hippursäure abgespaltenen Benzoesäure ein verhältnismäßig reines Produkt erhalten, das höchstens durch die leichter flüchtigen Fettsäuren, die aus dem Chloriden des Harns abgespaltene Salzsäure, die aus Carbonaten und Harnstoff stammende Kohlensäure, welch letztere aber fast quantitativ durch Wasserstoff wieder entfernt wird u. s. w. verunreinigt wird. Wir hatten bei diesen ersten Versuchen leider versäumt, auch zugleich Bestimmungen der Hippursäure nach der Henneberg'schen Methode anzusetzen, jedoch habe ich diese Vorsichtsmaßregeln bei meinen späteren Versuchen angewandt, und ich werde bei der Besprechung derselben unter Angabe der Ergebnisse die notwendigen Erläuterungen folgen lassen.

Ich lasse nunmehr die analytischen Ergebnisse der beiden ersten Perioden folgen, ohne jedoch erst die Resultate der Alkaleszenzbestimmungen zu erwähnen, da diese sich als absolut bedeutungslos erwiesen. Es sei nur noch bemerkt, daß der Harn immer auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt wurde, weil wir uns dadurch die Bestimmung des spez. Gewichts ersparten, und daß die Analysenergebnisse der für die einzelnen Bestimmungen entnommenen aliquoten Teile auf die ganze Tagesausscheidung umgerechnet wurden.

I. Normalperiode.

700 g Wiesenheu, 50 g Weizenschalen, 10 g Kochsalz.

Tag	Hippursäure g				Ges. Stickstoff g			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	12,9460	14,5658	13,7738	13,8476	8,2238	8,2718	7,4278	7,1779
2	12,8628	14,0304	—	13,8992	8,2301	8,3742	5,9912[1])	6,8272
3	13,2104	13,8664	13,8254	13,8930	8,2542	7,6170	7,7326	7,0578
4	12,6716	13,6228	14,2894	14,7066	8,5328	7,3317	7,4662	7,0963
5	12,8554	13,2080	13,3556	14,4564	8,3310	6,9569	7,4622	7,0386
6	12,8940	14,2076	14,1735	14,1366	8,1483	7,5716	7,1395	6,4236
i.Mitt.	12,9067	14,0835	13,8835	14,1566	8,2867	7,6889	7,3857	6,9202

II. Periode: Stärkezulage.

700 g Wiesenheu, 50 g Weizenschalen, 10 g Kochsalz, 150 g Stärke.

1	13,2181	12,8106	11,5044	12,6606	6,8607	5,2466	5,2907	4,6905
2	11,0316	12,7571	12,7898	13,7123	5,5668	4,9871	5,6585	4,5307
3	15,0522	11,4015	13,6569	12,7590	5,9128	4,2857	5,6247	4,3032
4	14,1994	14,2904	12,3327	12,5972	6,1497	4,8237	5,3681	5,0680
5	14,1996	14,1368	13,5381	13,8395	6,1113	4,1943	5,3536	4,8986
6	13,0106	13,9192	12,3450	12,2897	4,9872	4,9343	6,3411	6,2636
7	12,2972	13,2071	12,0191	12,2712	4,5226	4,4874	5,4020	5,4310
8	13,8558	14,2475	12,0006	12,0006	5,5923	4,1271	5,4746	5,6537
i.Mitt.	13,3581	13,3463	12,5233	12,7663	5,7129	4,6333	5,5629	5,0548

Hatte nun der Fütterungsversuch mit Stärke einen derartigen Umschwung in der Ansicht über die Wirkung derselben zur Folge gehabt, lag es sehr nahe, jetzt auch einen Versuch mit einer ziemlich hohen Eiweißgabe zu machen, um zu sehen, ob hierbei etwa ähnliche Ergebnisse zu Tage träten. Da uns aber das Heu zur Fütterung für weitere Untersuchungen ausgegangen

[1]) An obigen einem Tage war höchstwahrscheinlich Harn verschüttet, daher die Unterschiede bei der Stickstoffbestimmung und das Fehlen der Zahlen für die Hippursäure-Ausscheidung.

war, war es unbedingt notwendig, mit dem neuen Heu nochmals eine mehrtägige Vorfütterung vor der Verabreichung von Eiweiß vorausgehen zu lassen. Dieses neue Heu mußte wohl noch erheblich reicher an Beimengungen von Klee gewesen sein, denn die Ausscheidung der Hippursäure sank noch so stark, daß man annehmen mußte, wenn überhaupt Eiweiß so deprimierend wirkt, wie man bisher annahm, die Hippursäure nunmehr auf kaum bestimmbare Spuren verschwinden mußte. Nach Versuchen von H. Grouven, besprochen von W. Henneberg[1]), verschwindet im Gegensatz zu den neueren von Kühn-Kellner[2]) nach Beigabe von Conglutin oder Fleischmehl zu dem gewöhnlichen Normalfutter, welches reichliche Mengen von Hippursäure zu erzeugen vermag, diese bis auf unbestimmbare Spuren. Auch Henneberg und Th. Pfeiffer[3]) fanden, nach Versuchen von Kern und Wattenberg, daß die Hippursäureausscheidung, welche bei zwei Hammeln in den beiden Normalperioden am Anfang und Schluß der Versuche 13, 67 und 15, 26 g bezw. 13, 81 und 14, 15 g pro Tag betragen hatte unter dem Einfluß einer steigenden Beigabe von Conglutin zum Normalfutter allmählich bis auf Spuren verschwunden war, und bei einer abnehmenden Beigabe von Fleischmehl wieder allmählich bis zu obiger Höhe stieg, eine Beobachtung, die mit früheren Angaben von Henneberg, von Meißner und Shepard[4]) insofern in Einklang steht, als auch diese Forscher eine starke Depression der Hippursäureausscheidung infolge größerer Körnerzusätze zum Rauhfutter beobachteten. Die einzige Erklärung für diesen Vorfall gibt Henneberg[5]), indem er sagt, die Muttersubstanz der Hippursäure gehöre in den gewöhnlichen vegetabilischen Futtermitteln aller Wahrscheinlichkeit nach zu den schwer verdaulichen Stoffen und trete umsomehr außer Funktion, je mehr leicht verdauliche Stoffe in Form von Zucker, Dextrin u. s. w. in die Futterration eingeführt würden. Diese Erklärung bezieht sich also auch auf die Verfütterung von Stärke,

[1]) Journ. f. Landw., Bd. 13 (1865), S. 162.
[2]) Landw. Versuchsstat., Bd. 44, S. 405 u. S. 528.
[3]) Journ. f. Landw., Bd. 38, S. 239.
[4]) Lf. Henneberg, Neue Beiträge, S. 369.
[5]) l. c. 370.

kann aber nach späteren Erfahrungen nicht mehr zu Recht bestehen, und ist auch von Henneberg und Th. Pfeiffer in einer späteren Veröffentlichung, die noch zu erwähnen sein wird, in entsprechender Weise abgeändert. Wir haben nach unseren Versuchen die Erfahrung gemacht, daß zwar die Kohlenhydrate auf die Eiweißzersetzung deprimierend einwirken, daß damit aber kein irgendwie wesentliches Sinken in der Hippursäureausscheidung verbunden war. Folglich kann in einem Futtermittel, welches nach der Beigabe von Stärke noch fast dieselbe Menge Hippursäure zu bilden vermag, die Muttersubstanz derselben nicht so schwer verdaulich sein, daß sie durch Beigabe leicht verdaulicher Stoffe unresorbiert zur Ausscheidung gelangt. Dieser Modus findet sich auch schon in einer schon mehrfach zitierten Arbeit von W. Henneberg und Th. Pfeiffer[1]), wo es heißt: daß einseitige Vermehrung der verdaulichen Eiweißsubstanz des Futters keine wesentliche Veränderung in der Verdaulichkeit seiner stickstofffreien Extraktstoffe bewirke.[2])

Unsere Versuche ergaben denn auch dasselbe Resultat, was nach der vorangegangenen Stärkezulage zu erwarten stand, es war überhaupt keine Rede von irgend welchem Zurückgehen der Hippursäure, im Gegenteil, bei allen vier Hammeln war gleichmäßig eine Steigerung derselben wahrnehmbar und zwar von 0,72 bis 1,89 g pro Tag. Die Tiere erhielten von dem neuen Heu, mit welchem wieder 6 Tage ohne Untersuchung vorgefüttert war, 700 g, dazu 50 g Weizenschalen und 10 g Kochsalz und die Untersuchungen auf Hippursäure und Stickstoff wurden 5 bezw. 3 Tage gemacht. Hierauf bekamen Hammel I und II pro Tag je 150 g, Hammel III und IV pro Tag je 200 g reinstes Pflanzeneiweiß, sog. Alenronat, welches wir von der Firma W. Hundhausen in Hamm i. Westf. bezogen, und welches nach der Analyse 82, 62 % Eiweiß enthielt. Der größeren Sicherheit wegen wurden auch nach der Gabe des Eiweißes die Untersuchungen 6 Tage unterbrochen, dann bei Hammel I und

[1]) Journal für Landw., Bd. 38, S. 230.

[2]) Ich muß allerdings hierzu bemerken, daß der in der zitierten Arbeit erwähnte Ausspruch sich damals speziell auf die Verdaulichkeit der stickstoffreien Extraktstoffe im allgemeinen bezog.

II noch 8 Tage, bei Hammel III und IV, die 200 g Eiweiß erhielten, aber nur 7 Tage Hippursäure- und Stickstoffbestimmungen gemacht, da die beiden letzterwähnten Tiere, wahrscheinlich infolge der hohen Eiweißgabe so starken Durchfall bekamen, daß ernstere Verdauungsstörungen zu befürchten waren, und daher dann die Ergebnisse vielleicht nicht mehr ganz einwandsfrei gewesen wären. Jedoch gefressen haben die Hammel immer ohne die geringsten Spuren von Futterresten, sodaß also in Bezug hierauf keinerlei Korrekturen an den resultierenden Analysen nötig waren. Wir hatten aber auch bei diesen Perioden wieder unterlassen, neben den Hippursäurebestimmungen nach unserer Methode auch solche nach Henneberg anzusetzen. Da jedoch bei meinen späteren Versuchen mit Fleischmehl diese Vorsichtsmaßregel nicht unterblieb, so hat man immer noch einen Vergleich der beiden Eiweißpräparate unter einander, deren Wirkung bei Aleuronat, dem Pflanzeneiweiß einerseits und entfettetem Fleischmehl, also tierischem Eiweiß andererseits, keine nennenswerten Unterschiede ergab. Aus der nächsten Tabelle ist eine deutliche Steigerung der Hippursäureausscheidung ersichtlich. Der Harn zeigte wieder dieselbe trübe und schleimige Beschaffenheit, wie bei der Fütterung mit Stärke. Die Erklärung liegt also auch hier wieder nahe, daß die Anreicherung der Colloidsubstanzen bei einer Eiweißzulage die Abscheidung der Hippursäure nach der Hennebergschen Methode verhindert, und daß auch nach anderen Methoden eine quantitative Isolierung der Hippursäure unmöglich ist. Daß tatsächlich diese Annahme berechtigt zu sein scheint, geht aus folgendem Versuch hervor, der bereits in unserer Veröffentlichung der Methode zur Bestimmung der Hippursäure[1]) erwähnt ist. Versetzt man z. B. 50 cc eines neutralen eingedampften Harns, ca. 1,0 g Hippursäure enthaltend, mit 10 cc einer titrierten Schwefelsäure entsprechend 1,9286 g Hippursäure, so bildet sich auch nach 48stündigem Stehen im Eisschranke nur ein verhältnismäßig geringer Niederschlag und bei der Untersuchung des Filtrates in der beschriebenen Weise findet man viel zu wenig Hippursäure. Letztere wird also mit

[1]) l. c. S. 279.

anderen Worten in größeren Mengen in Lösung gehalten, vermag jedoch in diesem Zustande lockerer Bindung auf Calciumkarbonat[1]), wenigstens teilweise, zersetzend einzuwirken. Die Gabe von Eiweiß wirkt daher naturgemäß nicht deprimierend auf die Hippursäurebildung- und -abscheidung ein, sondern es findet sogar je nachdem, ob viel oder wenig Eiweiß dem Zerfall anheimfällt, also dementsprechend mehr oder weniger aromatische Zersetzungsgruppen der Proteinsubstanzen entstehen, eine gar nicht unerhebliche Steigerung der Hippursäureausscheidung statt. Ja, aus den gefundenen Zahlenreihen geht diese Erscheinung mit einer Schärfe hervor, wie sie genauer gar nicht gedacht werden kann. Hammel I und II zum Beispiel zeigen ziemlich erhebliche Unterschiede in der Stickstoffausscheidung, bei Hammel I fallen offenbar mehr Eiweißsubstanzen der Zersetzung anheim, als bei Hammel II, denn die Stickstoff- und Hippursäureausscheidung sind bei diesem bedeutend geringer, infolgedessen ist es auch gar nicht wunderbar, daß letztere in Vergleich zu Hammell I gegenüber der Normalperiode eine etwas schwächere Steigerung erfährt. Hieraus geht hervor, daß die Tatsache, »die einseitige Vermehrung der verdaulichen Eiweißsubstanz des Futters bewirkt keinerlei wesentliche Veränderung in der Verdaulichkeit seiner stickstoffreien Bestandteile«, vollständig auch hier zur Geltung kommt, und es daher ein Rätsel sein mußte, wenn durch Beigabe von Eiweiß einerseits, Kohlenhydraten, für die, was ihre Einwirkung auf das Hippursäurebildungsvermögen angeht, im großen und ganzen dasselbe gilt, andererseits die Hippursäure im Harn zum Verschwinden gebracht wurde. Ob es gelingen wird, die Substanzen zu finden und zu bestimmen, welche diese Schwierigkeiten bei allen Methoden für die Hippursäurebestimmung entgegensetzen, ist eine Frage, die ich vorläufig noch vollständig offen lassen muß. Es folgen jetzt die Zahlenergebnisse, aus welchen mit deutlichster Schärfe hervorgeht, wie genau die vier Tiere auf das dargereichte Futter reagiert haben.

[1]) Ebendaselbst Bd. II, S. 279.

III. Periode: Normalperiode mit neuen Harn.

700 g Heu, 50 g Weizenschalen, 10 g Kochsalz.

Tag	Hippursäure g				Ges. Stickstoff g			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	11,5810	11,3492	10,5432	10,6254	—	—	—	—
2	10,8996	9,4848	9,8429	10,6254	—	—	—	—
3	10,5984	8,9394	10,2324	9,8912	6,6210	7,2495	8,2476	7,6838
4	10,1410	9,4733	10,8936	10,6623	6,8290	7,7114	7,2381	6,8600
5	10,0744	9,2373	10,9982	10,8120	6,7483	7,0917	6,4338	6,4800
i.Mitt.	10,6589	9,6968	10,5021	10,4459	6,7327	7,3509	7,3065	7,0076

IV. Periode: Eiweisszulage.*)

700 g Heu, 50 g Weizenschalen, 10 g Kochsalz.

Hammel I und II 150 g, Hammel III und IV 200 g Eiweiß.

1	12,7082	11,0140	13,2070	12,2565	—	21,9884	27,3789	27,0055
2	12,8094	12,1644	13,1491	11,8146	21,6774	20,4875	26,3541	30,7667
3	11,5962	10,9658	12,1826	12,3880	23,7089	21,7675	27,3511	31,2830
4	—	9,9288	13,4524	11,7710	25,8214	21,0284	30,3474	28,3226
5	11,6090	10,2138	10,9161	11,8740	23,2783	21,1808	26,4370	28,3915
6	11,0680	9,5173	12,1608	11,7080	22,1789	19,3751	29,3300	29,3730
7	12,0534	9,0709	11,5482	11,8901	23,6430	21,7142	29,3214	29,3558
8	11,8796	10,4795	—	—	23,2783	19,6837	—	—
i.Mitt.	11,9734	10,4193	12,3737	11,9575	23,3795	20,9032	28,0743	29,2126

Wir haben also an dem zuletzt angeführten Versuche gesehen, daß Eiweiß nicht allein keine Depression der Hippursäureausscheidung zu bewirken vermag, sondern daß sogar die aromatischen Zerfallprodukte desselben zur Oxydation gelangen und noch mit zu weiterer Bildung von Hippursäure beitragen, und schließlich findet ja diese Erscheinung, so sehr sie auch im Widerspruch zu der früher vertretenen Ansicht steht, ihre Er-

*) Bei dieser Periode möchte ich nicht unterlassen, noch extra darauf aufmerksam zu machen, daß Hammel I und II 150 g, Hammel III und IV 200 g Eiweißzulage in Form von Aleuronat erhielten.

klärung darin, daß die einseitige Vermehrung der verdaulichen Eiweißsubstanz des Futters keine wesentliche Veränderung in der Verdaulichkeit seiner stickstoffreien Bestandteile bewirkt. Aus später gefundenen Zahlenreihen ist auch deutlich ersichtlich, daß bei dieser hohen Eiweißgabe eine bedeutend gesteigerte Eiweißfäulnis stattgefunden haben muß, denn sowohl die Gesamtschwefelsäure, wie auch die Ätherschwefelsäuren sind ungefähr um das doppelte ihres früheren Wertes gestiegen.

Vor Auffindung unserer neuen Methode hatten wir einen Versuch mit der Fütterung von Natriumacetat gemacht und dabei gefunden, daß die Hippursäure, die damals noch nach der Henneberg'schen Methode bestimmt wurde, stark zurückging. Die Ausscheidung war von 8,36 resp. 9,79 g bei zwei Versuchstieren auf 3,63 resp. 4,65 g gesunken. Diese Erscheinung brachte uns auf den Gedanken, daß vielleicht die durch Darreichung von Natriumacetat enorm gesteigerte Alkalität des Harns mit der beobachteten Erscheinung in Verbindung stehe. Obwohl nun spätere Versuche, bei denen auch eine hohe Alkalität im Harn zu konstatieren war, uns überzeugten, daß diese absolut belanglos zur Bildung resp. Nichtbildung von Hippursäure sei, wollten wir uns doch überzeugen, ob sich bei Fütterung von Natriumacetat die früher gemachte Beobachtung bestätigen würde, wenn wir jetzt die Hippursäure mit unserer neuen Methode bestimmten. Der Versuch zeigte, daß bei allen vier Versuchstieren nicht nur kein Sinken, sondern sogar bei dreien eine minemale, bei dem vierten eine ziemlich erhebliche Steigerung zu konstatieren war. Dieses Ergebnis kann nicht anders gedeutet werden, als daß es die Mangelhaftigkeit der Henneberg'schen Methode war, welche uns die irrelevanten Schlüsse ziehen ließ. Die Wirkung von Natriumacetat ist eine rapide infolge der plötzlichen Steigerung der Diurese, die wie beim Hunde auch beim Wiederkäuer sofort eintritt. Die Wasseraufnahme steigert sich bis auf das dreifache und infolgedessen auch die Harnausscheidung. Eine Vermehrung des Harnstickstoffs, welche Salkowsky und Munk[1]) bei

[1]) Arch. für path. Anat. 1877, Bd. 71, S. 500 nach Hermann, Handbuch der Physiologie.

Darreichung von 10 g Natriumacetat an einem Hunde konstatiert haben, und die bei ihren Versuchen 3 bis $5^1/_2$ % betrug, fand bei unseren Versuchen nicht statt. Auch H. Weiske[1]) hat schon früher gefunden, daß Essigsäure, die er Hammeln ebenfalls in Form von essigsaurem Natron gab, keineswegs eiweißsparend wirkte, sondern sogar den Eiweißumsatz, wenn auch nur in geringem Maße steigerte; die Gesamtstickstoffausscheidung stieg bei Darreichung von Natriumacetat von 16,54 auf 17,04 g. Auch Salkowsky[2]) fand bei Wiederholung seiner Versuche, daß zwar keine Eiweißersparnis, aber auch keine wesentliche Steigerung des Eiweißzerfalls, wie Feder beobachtet haben will, zu konstatieren war: „Es findet lediglich eine mechanische Ausspülung der Gewebsteile statt, sodaß es sich höchstens um eine Störung in der Harnstoffbildung handeln kann."

Selbstverständlich lassen sich Versuche mit so hohen Gaben von Natriumacetat (80 g pro Tag und pro Kopf) nicht lange fortführen, weil die Versuchstiere sehr bald erkranken. Wir mußten uns daher mit einer Periode von drei Tagen allerdings mit vier Tieren begnügen. Das dargereichte Natriumacetat wurde den Hammeln in zwei Rationen und in je 500 cc Wasser gelöst mittels einer Schlundsonde verlustfrei eingegeben, weil es auf diese Weise direkt in den Magen geführt wird, sodaß es die Tiere nicht wieder von sich zu geben vermögen. Obwohl die Wirkung, wie gesagt, eine sehr schnelle ist, und der Wasserkonsum sehr gesteigert wird, fraßen die Tiere während der ersten drei Tage das dargereichte Futter ohne Reste auf, sodaß die Versuchsergebnisse also vollständig einwandsfrei sind. Die Stickstoffausscheidung blieb fast dieselbe, dagegen weist die Hippursäure in allen Fällen eine schwache Steigerung auf.

Der dreitägige Versuch ergab folgende Zahlen:

[1]) Journ. für Landwirtschaft 37, S. 203 und S. 227.
[2]) Zeitschr. für Physiologie Bd. 2, S. 394.

V. Periode.

700 g Wiesenheu + 50 g Weizenschalen + 10 g Kochsalz + 80 g Natriumacetat in 500 cc Wasser gelöst:

Tag	Hippursäure g				Ges. Stickstoff g			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	9,9820	9,9306	12,4548	10,6712	7,1894	7,4620	7,1291	7,1176
2	10,6832	9,0280	12,3742	10,5612	7,2625	7,2898	6,7029	6,7330
3	11,2284	9,9639	12,5210	10,6272	6,5780	5,7285	6,8880	7,0028
i. Mitt.	10,6312	9,6408	12,4500	10,6198	7,0099	6,8268	6,9067	6,9511

Zum Vergleiche folgen hier die Mittelzahlen der Grundfutterperiode:

10,6098	9,6068	10,5021	10,4459	6,7327	7,3509	7,3065	7,0076

Aus diesen Versuchsergebnissen geht also deutlich hervor, daß durch essigsaures Natrium weder auf einen größeren Zerfall des Eiweisses hingewirkt wird, noch daß die Hippursäurebildung auch nur die geringste Depression erleidet. Würde ersteres der Fall sein, so müßte man sogar eine mehr oder minder geringe Erhöhung in der Hippursäureausscheidung wahrnehmen, da ja dann doch ein Teil der aromatischen Zerfallprodukte des Eiweisses zu einer Mehrbildung von Hippursäure beitragen würde.

Das Gesamtresultat dieser hier aufgeführten Versuche ist also zunächst, daß die Frage über die Bildung der Hippursäure aus ganz anderen Gesichtspunkten betrachtet werden muß, da allem Anschein nach die bisherigen Mittel nutzlos sind, durch irgend ein Beifutter zu einer Grundration, welche viel Hippursäure zu bilden vermag, entweder die Bildung derselben zu verhindern, oder doch wenigstens einzuschränken. Wir sind also durch diese Versuche der Lösung der Frage eigentlich noch keinen Schritt näher gekommen, aber das war ja auch vorläufig nicht unsere Absicht, sondern es war uns zunächst daran gelegen, zu ergründen, ob die bisher ausgeführten Versuche als zu Recht bestehend gelten könnten, wenn es gelungen war, jetzt endlich eine Methode zur Bestimmung der Hippursäure aufzu-

finden, die vollkommen einwandsfreie und wirklich richtige Resultate gestattet. Leider haben wir uns aber überzeugen müssen, daß durch Methoden, die wohl mit einander übereinstimmende Analysenergebnisse liefern, trotzdem an einer nicht vorherzusehenden Fehlerquelle laborierten, Hypothesen aufgestellt sind, die jetzt in Fortfall kommen müssen.

b) Übersicht und Deutung der an die Vorversuche anknüpfenden Untersuchungen.

An diese Versuche knüpft nun meine neue Arbeit an, die teilweise der Sicherheit wegen noch einmal auf Bestätigung unserer bisher erzielten Resultate hinlenkt, andererseits aber bezweckt, die, oder wenigstens eine der Muttersubstanzen zu finden, aus welchen im Tierkörper die Benzoesäure entsteht, die durch ihre Vereinigung mit Glycocoll dann in Form von Hippursäure zur Abscheidung gelangt. Die Übereinstimmung der Versuchsergebnisse mit vier Tieren hatte zur Evidenz bewiesen, daß die individuellen Unterschiede derselben nicht so groß sind, daß man nicht auch mit zweien von diesen einwandsfreie und gut übereinstimmende Resultate erzielen kann. Ich wählte für meine nun folgenden Versuche Hammel III und IV aus, die mir am passendsten zu sein schienen, weil sie ungefähr die gleiche Menge Harn und Kot lieferten, auch sonst während der früheren Untersuchungen die geringsten individuellen Unterschiede gezeigt hatten. Mein Versuchsplan zielte darauf, zunächst noch einmal, allerdings unter Anwendung anderer, aber in physiologischer Beziehung ähnlicher Futtermittel, unsere letzten Resultate zu prüfen, dann noch zu untersuchen, ob Kleeheu nun wirklich so geringe Mengen Hippursäure zu liefern vermöchte, oder ob etwa auch hier die Colloidsubstanzen des Harns die Abscheidung der Hippursäure verhindern oder wenigstens einschränken, und wenn ersteres der Fall, zu erforschen, woran es liegt, daß Wiesenheu so reichliche, Kleeheu dagegen so spärliche Mengen von Hippursäure liefert.

Obwohl meine Versuche, weil die erforderlichen Futtermittel nicht immer sofort zu beschaffen waren, in willkürlicher Reihenfolge gemacht werden mußten, will ich sie hier der besseren

Übersicht beim Vergleichen wegen so ordnen, daß sie der Reihenfolge nach mit unseren früheren Versuchen in Parallele stehen. Selbstverständlich ging wieder unter Berücksichtigung der schon erwähnten Vorsichtsmaßregeln eine Grundfutterperiode von sechs Tagen (mit einer 6tägigen Vorfütterung ohne Untersuchung voraus), und hieran schließen sich dann die anderen Perioden der Reihe nach an. Zur Untersuchung gelangte anfangs nur der Harn, später auch der Kot aus nachher zu erörternden Gründen. Vom Harn wurden bestimmt Gesamtstickstoff, Gesamt- und Ätherschwefelsäure und Hippursäure, auf die Bestimmung der Alkalescenz durfte ich ja aus bereits bekannten Gründen verzichten. Weiske[1]) und auch andere Forscher, z. B. Henneberg, hatten bei Fütterung von Bohnen eine Depression der Hippursäure wahrgenommen. Da aber Bohnen bekanntlich ein stickstoffreiches Futtermittel, zugleich mit einem großen Gehalt an leicht verdaulichen Kohlenhydraten, vorstellen, unsere früheren Versuche aber ergeben hatten, daß weder durch Beigabe von Eiweiß, noch auch von Kohlenhydraten zu einem Futter, welches reichliche Mengen von Hippursäure zu bilden vermag, eine Depression derselben zu erzielen war, schien mir auch die Sache so zu liegen, daß Weiske bei Anwendung der Hennebergschen Methode viel zu niedrige Zahlen bekommen hatte. Wie ich schon erwähnt habe, holte ich bei meinen sämtlichen jetzigen Versuchen das nach, was wir bei unseren früheren Versuchen leider versäumt hatten, nämlich außer der Bestimmung nach unserer Methode die Hippursäure wenigstens jeden zweiten Tag auch nach der Hennebergschen Methode zu bestimmen, und es kam nun, wie zu erwarten war, auch so, daß ich tatsächlich bei Anwendung der Hennebergschen Methode in der Periode der Fütterung mit Bohnenschrot, welche ich nach 6tägiger Verfütterung bei einer Gabe von 400 g Bohnenschrot 8 Tage andauern ließ, ein ganz bedeutendes Sinken in der Ausscheidung der Hippursäure konstatieren konnte. Da die Tiere aber eine Ration von 700 g Wiesenheu, 50 g Weizenschalen und 400 g Bohnenschrot nicht sehr lange gefressen haben würden, zog ich ihnen von der Grundfutterration 2/7, nämlich

[1]) Zeitschr. f. Biologie Bd. 12, S. 251.

200 g Wiesenheu und 14 g Weizenschalen ab, sodaß jedes Tier erhielt: 500 g Wiesenheu, 36 g Weizenschalen und 400 g Bohnenschrot. Bei der tabellarischen Berechnung aber habe ich der Einheit halber die Umrechnung so vorgenommen, daß ich von der ursprünglichen Grundration ausging und prozentisch für jede einzelne Bestimmung hinzuzählte, was sich aus der Berechnung der abgezogenen Futtermenge ergab. Ich habe deshalb auch in der Tabelle die Ergebnisse so zusammengestellt, als ob ich von der Grundration direkt ausgehend den Versuchstieren 400 g Bohnenschrot als Beifutter zugelegt hätte.

I. Periode: Grundfutter.

700 g Wiesenheu + 50 g Weizenschalen + 10 g Kochsalz.

Tag	Gesamtstickstoff g		Ges. SO_3 g		Äther-SO_3 g		Hippursäure n. unserer Methode g		Hippursäure n. d. Henneberg'schen Methode g	
	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV
1	7,4675	5,6394	1,3192	1,1453	1,1648	0,9014	11,4723	11,4392	10,6500	—
2	6,1373	5,5302	1,3398	1,1388	1,0002	0,9236	12,0631	12,1988	—	10,5200
3	6,3482	5,7498	1,2173	1,1546	1,0002	1,0197	12,6006	12,4521	12,1250	—
4	6,5247	5,5862	1,2461	1,2939	0,8747	0,9529	12,3770	12,1988	—	12,3125
5	5,5433	5,5691	1,3984	1,2132	0,9776	0,9065	12,6282	12,1548	12,9200	—
6	6,4860	5,5431	1,2185	1,2708	1,0074	0,9467	12,8594	12,0998	—	11,9500
i.M	6,4162	5,6029	1,2899	1,2028	1,0042	0,9418	12,2634	12,0906	11,8980	11,5940

II. Periode: Bohnenschrotzulage.

700 g Wiesenheu + 50 g Weizenschalen + 400 g Bohnenschrot + 10 g Kochsalz.

1	13,4468	11,8163	1,3713	1,4556	1,0029	1,1137	15,2517	14,0342	—	—
2	13,4399	12,8031	1,3929	1,3423	1,1295	1,1197	14,3733	14,0033	7,3983	6,1514
3	13,4781	12,8918	1,3455	1,6603	0,8631	1,2106	15,0025	14,7050	7,4530	7,2420
4	13,3387	12,9686	1,3733	1,4533	0,9134	1,0870	15,7296	13,7258	—	—
5	13,4376	13,5241	1,4667	1,5214	0,9349	1,3267	14,4885	14,2953	2,5368	2,6607
6	13,4894	13,4543	1,6458	1,5523	0,9267	1,1209	14,9042	14,3415	3,1150	3,4620
7	13,3454	13,3281	1,5873	1,5265	1,0029	1,1447	13,9286	14,1182	—	—
8	13,4331	13,3373	1,6581	1,6429	1,0821	1,1026	15,0572	14,1413	2,5082	2,5354
i.M	13,4262	13,0268	1,4801	1,5107	0,9820	1,1545	14,8419	14,1706		

Ob die Grundration etwas knapp gewesen ist, und daher vielleicht während der Periode mit Bohnenschrotzulage ein Fleischansatz stattgefunden hat, wage ich nicht zu entscheiden; immerhin wäre es nicht unmöglich, da mir das Plus an Stickstoff während der Periode mit Bohnenschrot etwas sehr gering erscheint. Denn während bei der Grundration die Stickstoffausscheidung im Mittel 6,42 g bei Hammel III und 5,60 g bei Hammel IV betrug, steigerte sich dieselbe bei der Fütterung mit der Zulage von Bohnenschrot nur auf 10,86 g bei Hammel III und auf 10,79 g bei Hammel IV. Und daß kein sehr erheblich gesteigerter Stickstoffumsatz im Tierkörper stattgefunden hat, geht auch aus den Ergebnissen der Bestimmung der Gesamtschwefelsäure hervor, die nicht bedeutend vermehrt ist, während die Bestimmung der Ätherschwefelsäure, deren Mittelzahlen während der Grundfutterperiode 1,0042 g SO_3 für Hammel III und 0,9418 g SO_3 für Hammel IV und bei der Bohnenschrotzulage 0,9103 g SO_3 für Hammel III und 1,0872 SO_3 für Hammel IV sind, gar keine Steigerung ergaben. Die eben erwähnten Zahlen sind natürlich direkt gefundene Werte, nicht etwa die berechneten, da ja bei der Feststellung, ob ein Eiweißumsatz stattgefunden hat, nur die direkten Zahlenergebnisse in Betracht kommen können. Da nun aber trotzdem absolut eine ganz erhebliche Steigerung der Hippursäureausscheidung bemerkbar ist, wenn man von der Grundration ausgehend die Berechnung durchführt, so geht daraus hervor, daß Bohnenschrot Substanzen enthalten muß, die im Tierkörper zu Benzoesäure oxydiert werden, selbst wenn man das Eiweiß berücksichtigt, welches, nach unseren Versuchsergebnissen zu schließen, auch nicht ganz vernachlässigt werden darf. Es ergibt sich also in der Hippursäureausscheidung bei der zweiten Periode mit Bohnenschrotzulage ein Plus von 2,58 g pro Tag bei Hammel III und von 2,08 g pro Tag bei Hammel IV. Vergleichen wir nun mit diesen Zahlen nach unserer Periode:

Grundperiode Hammel III 12,2634 g Hammel IV 12,0906 g
Bohnenschrotzulage „ III 14,1706 g „ IV 14,1706 g

die Ergebnisse der Untersuchung der ausgeschiedenen Hippursäure nach der Hennebergschen Fällungsmethode, wobei ich be-

merken will, daß auch für diese selbstverständlich die erforderliche Umrechnung stattgefunden hat. Die Analysen wurden (natürlich ebenfalls immer mit Kontrollbestimmungen) an 5 Tagen gemacht, doch so, daß nur am 2. und 3., am 5. und 6 und am 8. Tage die Hippursäure neben unserer auch nach der Hennebergschen Methode bestimmt wurde. Schon der erste Versuch ergab bei Anwendung dieser Methode bei beiden Tieren gleichmäßig ein ganz erhebliches Sinken um rund 50 %, das sich gegen Ende der Periode mehr und mehr steigerte. Während, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist, am 2. und 3. Tage noch 7,3983 und 7,4530 g bei Hammel III und 6,1514 und 7,2420 g bei Hammel IV bestimmt werden konnte, sank die Hippursäureausscheidung am letzten Versuchstage auf 2,5082 g bei Hammel III und auf 2,5354 g bei Hammel IV.[1]) Und wenn man bei der Bestimmung der Hippursäure nach der Hennebergschen Methode, wie wir sie ausführten, nämlich in Gooch-Tiegeln, bedenkt, daß die gefundenen Zahlenwerte eher noch zu hoch als zu niedrig sind, weil das Waschwasser lange nicht genügende Zeit mit der Hippursäure in Berührung bleibt, um sich damit zu sättigen, der Lösungskoeffizient also auf alle Fälle als zu hoch angenommen wird, so kann man sich ein Bild machen, welche Fehler diese Methode trotz guter Übereinstimmung der einzelnen Analysenwerte bedingt. Sobald man normalen Harn hat, der nicht durch diese undefinierbaren Colloidsubstanzen verunreinigt wird, gibt auch die Hennebergsche Methode, wie aus vorangegangener Tabelle ersichtlich ist, ganz leidliche Resultate, sobald aber durch eine Beigabe von Kohlenhydraten, Eiweiß oder ähnlichen Substanzen die Harnabscheidung in eine andere Phase gelenkt wird, ist es, außer nach unserer Methode nicht mehr möglich, die Hippursäure von ihren festanhaftenden Beimengungen zu isolieren und quantitativ zu bestimmen.

Der nunmehr folgende Versuch mit Beigabe von 200 g so vollkommen wie möglich entfettetem Fleischmehl sollte eine Bestätigung unseres früheren Versuches mit Aleuronat (Pflanzen-

[1]) Dieses Ergebnis ist umso interessanter, als während der Grundperiode die Ergebnisse der Hippursäurebestimmung nach unserer Methode mit denen nach der Hennebergschen fast vollständig übereinstimmten.

eiweiß) bringen. Das Fleischmehl lieferte die chemische Fabrik von E. Merck in Darmstadt und da es fast ganz geruchlos und von angenehmen Geschmack war, fraßen es die beiden Hammel von vornherein ohne Widerstreben, und ohne die geringsten Futterreste zu lassen. Es trat auch nicht die abführende Wirkung des Aleuronats dabei ein, obwohl der Kot erheblich mehr Feuchtigkeit enthielt. Auch hier fiel mir sofort wieder die trübe, schleimige Beschaffenheit des Harns auf, und es war vorauszusehen, daß die Hippursäurebestimmungen nach der Hennebergschen Methode auch jetzt wieder bedeutend zu niedrige Resultate geben würden. Leider konnte ich nur an 2 Tagen von 6 Untersuchungstagen Hippursäurebestimmungen nach beiden Methoden zusammen ausführen, da ich aus gleich zu erörternden Gründen für mehr Untersuchungen keine genügenden Mengen Harn hatte. Da es mir nämlich inzwischen gelungen war, im Kot Benzolderivate nachzuweisen, indem ich denselben mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung oxydierte, um etwa in ihm enthaltene aromatische Gruppen zu Benzoesäure zu oxydieren, mußte ich diese Manipulation jetzt mit Harn ausführen, um zu erfahren, ob etwa auch hier aromatische Körper, ohne oxydiert zu sein, ausgeschieden würden. Und daher war der Harn, zumal die quantitative Ausführung dieser letzteren Bestimmungen, wie auch bei späterer Beschreibung ersichtlich wird, keineswegs sehr einfach ist, manchmal etwas knapp. Jedoch ist der Ausfall der Ergebnisse der Hippursäurebestimmung nach der Hennebergschen Methode so schlagend, daß die geringe Anzahl der Analysen an dem Gesamtresultat absolut nichts ändert. Während sich bei Untersuchung des Harns in der Normalfutterperiode immer ein dicker brauner Niederschlag von Hippursäurekristallen absetzte, war hier kaum eine Ausscheidung zu bemerken, und ich zweifele sehr, ob sich das, was sich bei der Wägung im Goochtiegel befand, mehr als 50 bis 60 % reine Hippursäure war. Das Ergebnis dieser beiden Versuchtage war das, daß nach unserer Methode 11,5031 und 11,9266 g, nach der Hennebergschen Methode 2,9048 g und 2,0743 g Hippursäure pro Tag gefunden wurden. Im übrigen fand durch diesen Versuch unser früherer mit Aleuronat seine selbständige Bestätigung, dadurch, daß durch die erhöhte Eiweiß-

fäulnis eine reichlichere Absonderung der aromatischen Abbauprodukte des Eiweißes und damit eine, wenn auch nur geringe, aber doch unverkennbare Steigerung in der Hippursäureausscheidung stattfand. Ich will hier nur auch gleich die erzielten Versuchsergebnisse folgen lassen, da ich, um die Erklärung für meine dann folgenden Resultate vorauszuschicken, auf ein anderes Gebiet überzugehen habe, und ich hoffe, daß diese meine Resultate wenigstens einen geringen Teil für die endgültige Lösung der Hippursäurefrage beigetragen haben.

Es folgt jetzt eine Kolumne in der nächsten Tabelle mehr, weil auch die Analysenbefunde von dem, betreffs Auffindung von etwa nicht im Tierkörper oxydierten Benzolderivaten, untersuchten Harn hier noch Platz finden müssen. Eine Beschreibung der Methode, nach der ich den Harn oxydiert und dann darin die Untersuchung auf Benzoesäure resp. auf Hippursäure gemacht habe, wird später noch eingehend folgen, hier kommt sie vor der Hand noch nicht in Betracht. Ebenso wird darüber an anderer Stelle noch ausführlich die Rede sein müssen, ob sämtliche aus Eiweiß zu bildende Benzoesäure, die im Tierkörper entweder durch direkte Oxydation oder durch Oxydation der aromatischen Zerfallprodukte des Eiweißes theoretisch gebildet zu werden vermag, resorbiert und dann als Hippursäure im Harn ausgeschieden wird, oder ob die Erklärung hierfür darin zu suchen ist, daß vielleicht schwerer zugängliche aromatische Produkte dann nicht der Oxydation zu Benzoesäure anheimfallen, sondern in irgend einer Form im Kot unresorbiert zur Ausscheidung gelangen. Doch jetzt folgen zunächst auf der nächsten Seite die Versuchsergebnisse der Eiweißzulage zum Grundfutter:

III. Periode: Grundfutter.

700 g Wiesenheu + 50 g Weizenschalen + 10 g Kochsalz.

Tag	Ges. Stickstoff g		Ges. Schwefelsäure g		Äther-Schwefelsäure g		Hippursäure nach unserer Methode g		Hippursäure n.u.Methode i.oxyd.Harn g	Hippursäure nach Henneberg g	
	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	III	IV
1	8,6523	8,2289	3,2400	3,0750	1,0497	0.9930	11,7195	11,3327	—	—	—
2	8,2784	7,9001	3,1770	3,0870	1,0392	0.9756	11,9043	11,2248	11,6763	—	11,2447
3	8,4180	7,9001	3,2700	3,0510	1,0320	0,9435	11,5031	11,2490	—	11,9108	—
4	8,5983	-	3,0810	—	1,0650	--	11,9266	—	—	—	—
5	8,4812	8,4180	3,1890	3,1020	1,0443	1,0272	11.7456	11,7744	12,0632	—	11,5005
6	8,7288	8,4405	3,2250	3,0750	1,0413	1,0176	11,8573	11,9592	—	11,6846	—
i. M.	8,5429	8,1775	3,1970	3,0800	1,0453	0,9934	11,7761	11,5080	11,8659	11,7977	11,3726

IV. Periode:

700 g Wiesenheu + 50 g Weizenschalen + 200 g Fleischmehl + 10 g Kochsalz.

1	21,1739	21,1289	5,6280	5,4540	2,2884	2,2752	11,6705	11,5508	—	—	—
2	21,5028	21,3392	5,6670	5,3430	2,2752	2,0436	12,0549	12,6109	—	—	—
3	21,7325	—	5,4150	—	2,0715	—	12,4878	—	12,4927	—	—
4	23,9938	22,1978	5,9520	6,1140	2,3082	2,2119	12,6679	12,8574	-	2,9048	3,4072
5	25,5388	24,8901	6,1590	6,1710	2,2824	2,2575	12,8805	12,5630	12,6810	—	—
6	22,3821	21,0974	6,0600	5,9460	2,3668	2,2761	12,7271	11,9649	—	2,6743	1,9995
7	—	22,2956	—	5,9730	—	2,2689	—	12,7380	—	—	—
i. M.	22,4070	22,1582	5,8035	5,8335	2,2654	2,2222	12,5814	12,3642	12,5869	—	—

In diesen meinen letzten Versuchen liegt also eine einwandsfreie Bestätigung unserer ersten, die wir, betreffs der Wirkung einer Beigabe von Eiweiß resp. Kohlenhydraten zu einem Grundfutter, welches reichlichere Mengen von Hippursäure zu erzeugen vermag, anstellten. Damit ist nun zwar eine Theorie aus dem Wege geräumt, die auf Grund ungenauer Bestimmungen aufgestellt war, und von der wir jetzt mit Leichtigkeit einsehen, daß sie eigentlich jeden Haltes entbehrte, aber der Frage, woraus nun die Hippursäure wirklich entstehe, sind wir dadurch keineswegs näher getreten. Ich glaubte den besten Weg darin gefunden zu haben, wenn ich nochmals an die alten Versuche von V. Hofmeister[1]), dessen Arbeit ich ja bereits citiert habe, anknüpfte, indem ich prüfte, in welchen Lösungsmitteln die Muttersubstanz der Hippursäure eventuell löslich wäre. Hofmeister verfuhr, wie er in seiner Arbeit schreibt, folgendermaßen: »Zunächst wurden 80 Pfd. Wiesenheu mit Wasser in großen Destillierapparaten unter gespannten Wasserdämpfen ausgekocht, das dabei entstehende Destillat der flüchtigen Stoffe wurde besonders aufgefangen, das Wasserdecoct wurde auf dem Wasserbade bis zur Lufttrockne eingedampft, die Rückstände des Heus wurden gleichfalls lufttrocken gemacht. Aus dem aufgefangenen Destillat gewann ich (durch Cohibieren und Schütteln mit Äther und Abdestillieren dieses) 17 g einer dicklichen, öligen, gelben, außerordentlich aromatisch riechenden Flüssigkeit von sehr brennendem Geschmack und saurer Reaktion; mit Kali geschmolzen, zeigte dieselbe deutliche Salicylsäure-Reaktion.« Mit der Fütterung dieses Körpers erzielte Hofmeister keine Reaktion, obwohl aromatische Körper darin enthalten gewesen sein müssen, da er sonst keine Salicylsäurereaktion nach der Kalischmelze hätte bekommen können. Bekanntlich aber werden eine Unmenge aromatischer Produkte durch die Kalischmelze bis zu Salicylsäure, also einem Oxykörper der Benzoesäure übergeführt. Von dem Wasserextrakt aß Hofmeister selbst täglich 80 bis 100 g, wobei er zur Abschwächung der Harnsäureproduktion jegliche Fleischnahrung vermied, jedoch auch ohne den geringsten Erfolg. Durch Ver-

[1]) l. c. S. 458 ff.

fütterung des mit Wasser extrahierten Wiesenheus erlitt die Hippursäureausscheidung nach der Meinung Hofmeisters nicht die geringste Depression. Nach meiner Ansicht aber geht aus seinen Worten hervor, daß er das extrahierte Heu im selben Verhältnis gewogen hat, wie das nicht extrahierte, ferner daß scheinbar auch die Futterrückstände nicht genügend genau beachtet sind, sonst hätte er, nach meinen eigenen Versuchen zu urteilen, nicht zu einem derartig erfolglosen Resultat kommen können, da ich ähnlich wie Hofmeister verfuhr.

25 kg des mittels einer Häckselmaschine möglichst fein geschnittenen Heus wurden mit 225 l Wasser von 90 bis 95° übergossen, gründlich gemischt und 24 Stunden stehen gelassen. Ich vermied das Kochen mit gespannten Wasserdämpfen aus dem einfachen Grunde, um die Beschaffenheit des Heus nach Möglichkeit nur wenig zu beeinflußen, sondern nur die in heißem Wasser löslichen Stoffe daraus zu extrahieren. Es kam mir zunächst nur darauf an, zu untersuchen, ob eventuell ein Teil der im Wiesenheu befindlichen Substanz, welche Hippursäure zu bilden vermag, löslich ist oder nicht, ferner daß das Versuchstier, welches ich für diesen Versuch benutzen wollte, keine Futterreste zurückließ, da sich einwandsfreie Berechnungen unter Berücksichtigung derselben besonders bei Wiederkäuern schlecht anstellen lassen. Der aus diesem Heu gewonnene Extrakt, der etwa, nachdem er bis zu vollständiger Trockne eingedickt war, ein Gewicht von 3 bis $3^1/_2$ kg repräsentierte, hatte einen angenehm bitterlichen Geschmack, und es stellte sich später heraus, daß er von dem Versuchshammel mit großer Begierde gefressen wurde. Ich konnte bei diesen Versuchen nur mit einem Tier arbeiten, weil mir die Apparate fehlten, um extrahiertes Heu in so großen Quantitäten herstellen zu können, als mehrere Tiere gefressen haben würden.

Ich ließ nun nach einer 5tägigen Vorfütterung mit extrahiertem Heu eine Periode von 9 Versuchstagen mit diesem folgen, bei welcher, wie auch bei den früheren Perioden, Gesamtstickstoff, Gesamt- und Ätherschwefelsäure und Hippursäure nach unserer und auch nach der Hennebergschen Methode untersucht wurden. Ich fütterte auch von diesem Heu 700 g, dazu 50 g

Weizenschalen und 10 g Kochsalz. Um aber einen Vergleich der Analysen dieser Periode mit den der Normalperiode anstellen zu können, mußte ich berechnen, wie viel Heu von diesem extrahierten dem der Normalperiode entsprachen. Wie aus der nachstehenden Tabelle hervorgeht, entsprachen 700 g Normalheu 839 g mit Wasser extrahierten; infolgedessen habe ich auch alle Zahlen daraufhin umgerechnet. Zu der Tabelle, welche nachstehend folgt, gehören, wie aus ihr ersichtlich, 3 Perioden. Bei der ersten wurde, wie schon erwähnt, 700 g Wiesenheu, 50 g Weizenschalen und 10 g Kochsalz gegeben, bei der zweiten eine Zulage von 80 g Heuextrakt, bei der dritten das Heu, welches zunächst mit heißem Wasser, darauf mit kalter 1,25 prozentiger Schwefelsäure extrahiert war. Die Umrechnung der Zahlenergebnisse mit extrahiertem Heu auf solches, wie es bei der zu Grunde liegenden Normalperiode angewandt wurde, ist aus der übernächsten Tabelle ersichtlich, welche die Trockensubstanzen der angewandten Futterstoffe enthält.

V. Periode.

700[1]) g extrahiertes Heu + 50 g Weizenschalen + 10 g Kochsalz.

Tag	Ges. Stickstoff g		Ges. Schwefelsäure g		Aether-Schwefelsäure g		Aether-Schw. mit modifiz. Methode g	Hippurs. n. uns. Methode g	Hippurs. n. Kennenberg g
	Absolute Ausscheidung	umgerechnet	Absolute Ausscheidung	umgerechnet	Absolute Ausscheidung	umgerechnet	umgerechnet	umgerechnet	umgerechnet
1	—	—	—	—	—	—	—	6,9710	6,0355
2	—	—	0,4336	0,3614	0,5008	0,4173	—	8,2059	—
3	5,1255	4,3003	0,3944	0,3311	0,4062	0,3385	—	7,6647	—
4	4,5880	3,8493	0,4020	0,3350	0,4404	0,3670	—	7,4442	7,8845
5	4,3268	3,6202	0,4088	0,3376	0,4822	0,4019	—	7,5026	—
6	4,4409	3,7159	—	—	—	—	—	7,8023	—
7	4,6090	3,8570	0,4774	0,4070	0,5022	0,4184	0,2767	7,6863	—
8	4,4138	3,6932	0,4994	0,4161	0,5206	0,4339	0,3917	7,5471	6,7055
9	4,3087	3,6050	0,4534	0,3780	0,4796	0,3997	0,2800	8,0054	—
i.M	4,5449	3,8059	0,4384	0,3819	0,4770	0,3979	0,3161	7,6588	6,8752

[1]) 700 g extrahiertes Heu entsprechen, wie aus den Trockensubstanzen aus nächster Tabelle zu berechnen ist, 839 g Normalwiesenheu.

VI. Periode.

700[1]) g extrahiertes Heu + 50 g Weizenschalen + 80 g Extrakt + 10 g Kochsalz.

Tag	Ges. Stickstoff g		Ges. Schwefelsäure g		Aether-Schwefelsäure g		Aether-Schw. mjt modifiz. Methode g	Hippurs. n. uns. Methode g	Hippurs. n. Henneberg g
	Absolute Ausscheidung	umgerechnet	Absolute Ausscheidung	umgerechnet	Absolute Ausscheidung	umgerechnet	umgerechnet	umgerechnet	umgerechnet
1	4,2567	3,5714	—	—	—	—	—	10,0956	10,4415
2	3,8100	3,2666	0,9892	0,8243	0,5132	0,4281	0,4042	10,1652	9,4523
3	4,1410	3,6582	0,8748	0,7290	0,5598	0,4665	0,3969	10,0757	9,9210
4	4,3055	3,7123	1,0320	0,8600	0,5115	0,4263	0,3352	10,0611	10,7250
5	4,2415	3,5747	1,0950	0,9126	0,6369	0,5248	0,4665	10,8059	—
6	4,2110	3,6330	1,1370	0,9475	0,6039	0,5032	0,4312	10,5457	—
i. M	4,1610	3,5694	1,0213	0,8547	0,5651	0,4798	0,4068	10,4582	10,1350

VII. Periode.

700 g mit Säure (H_2SO_4 von 1,5 % Geh.) extrahiert + 50 g Weizenschalen + 10 g Kochsalz.

1	—	—	—	—	—	—	—	7,9400[2])	—
2	4,2216	—	0,6606	—	0,3354	—	0,2724	8,1230[2])	—
3	5,5219	—	0,6188	—	0,2860	—	0,2318	6,9030[2])	5,7038
4	7,0765	—	—	—	—	—	—	6,5530[2])	3,8612
5	6,5940	—	0,6674	—	0,4706	—	0,4146	5,4030[2])	3,5702

[1]) 700 g extrahiertes Heu entsprechen, wie aus den Trockensubstanzen aus nächster Tabelle zu berechnen ist, 839 g Normalwiesenheu

[2]) Abgesehen vom ersten Untersuchungstage wurden so große Futterreste gelassen, daß die Hippursäure nur schätzungsweise zu bestimmen ist, die oben angegebenen Zahlen sind die direkt gefundenen Werte.

Trockensubstanzen der Normalfutterperiode.

	48,0135	47,6155	49,5491	49,1255
	45,0400	45,0400	46,3500	46,3500
Angewandt:	2,9735 g	2,5755 g	3,1991 g	2,7755 g
		86,62 % Trcksbst.	86,76 % Trcksbst.	

i. M. 86,69 % Trcksbst.

Periode mit extrahiertem Heu.

	44,7100	44,4700	44,5495	44,3129
	42,1500	42,1500	42,0928	42,0928
Angewandt:	2,5600 g	2,3200 g	2,4567 g	2,4567 g
		90,62 % Trcksbst.	90,39 % Trcksbst.	

i. M. 90,50 % Trcksbst.

Periode mit Heu, durch Wasser u. H_2SO_4 (1,5 %) extrahiert.

	44,5931	44,4072	44,3512	44,1444
	42,0371	42,0371	41,6341	41,6341
Angewandt:	2,5560 g	2,3701 g	2,7171 g	2,5103 g
		92,73 % Trcksbst.	92,39 % Trcksbst.	

92,56 % Trcksbst.

Trockensubstanz des Heuextraktes.

	53,8300	53,3272	52,2664	51,6827
	45,9728	45,9728	43,8364	43,8364
Angewandt:	7,8572 g	7,3544 g	8,4300 g	7,8463 g
		93,60 % Trcksbst.	93,08 % Trcksbst.	

93,34 % Trcksbst.

Im Gegensatz zu Hofmeisters Resultaten trat sofort eine Depression in der Hippursäureausscheidung ein und die Zahlenergebnisse der 9tägigen Periode stimmen so schön untereinander überein, um annehmen zu können, daß sich der Hammel bereits nach 5tägiger Vorfütterung vollständig auf die Ration eingestellt hatte. Während in der Grundfutterperiode die tägliche Hippursäureausscheidung im Mittel 12,2634 g betragen hatte, sank dieselbe bei Fütterung des mit heißem Wasser extrahierten Heus im Mittel der neun Tage bis auf 7,6588 g, ja an einem Tage sogar auf 6,971 g. Aus diesen Zahlen geht wohl zweifelsohne hervor, daß ein verhältnismäßig großer Teil der Hippursäure-Muttersubstanz im Wasser löslich ist, daher nicht zur Rohfaser gehören kann. Zum Teil, so ist wohl anzunehmen, ist die fragliche Substanz auch in dem Eiweiß enthalten, welches in Lösung geblieben und nicht coarguliert ist, aber auch nur zu einem sehr geringen Teil. Denn wie aus dem Versuch mit Fleischmehl hervorgeht, vermochten 200 g Fleischmehl die Hippursäureausscheidung um noch nicht 1,0 g pro die im Mittel zu erhöhen, wie viel weniger vermag hier das wenige Eiweiß, welches in Lösung geblieben ist, dieselbe um 4,6 g pro die herabzudrücken. Das Eiweiß kann es also nicht sein, daher ist wohl das nächstliegende, daß man auf das Vorhandensein größerer Mengen aromatischer Körper schließt, und tatsächlich will ja auch O. Loew[1]) beispielsweise Chinasäure im Wiesenheu nachgewiesen haben, wenngleich er den sichersten Beweis, durch die Analyse chemisch reine Chinasäure aus Wiesenheu herzustellen, nicht zu erbringen vermag. Möglich ist aber immerhin, daß sich Chinasäure in landwirtschaftlichen Futtermitteln findet, welche Benzoesäure im Tierkörper zu erzeugen vermögen. Dagegen muß die Menge an chinasauren Salzen nicht allzugroß sein, da sonst der Nachweis durch die Elementaranalyse nicht so schwer zu erbringen wäre. Auch andere Körper der aromatischen Reihe, wie Toluol, Xylol, Trimethylbenzole, Cymol, Styrol etc., die man sonst wohl in einigen Pflanzen nachgewiesen hat, sind bisher in Wiesenheu noch nicht aufgefunden worden.

[1]) Journ. für prakt. Chemie N. F. Bd. 19, S. 309 u. Bd. 20, S. 476.

Und schließlich schwebt auch über die Möglichkeit, daß etwa die Pentosen, wie Th. Pfeiffer und seine Mitarbeiter[1]) in ihrer Arbeit über die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus annehmen, zu dieser in unmittelbarer Beziehung ständen, noch ein gewisses Dunkel. Denn jedesmal hat sich der Versuch, durch Beifütterung von Pentosen das Hippursäurebildungsvermögen zu steigern, auch nicht bestätigt. Es wäre daher auch möglich, daß das Kirschgummi, welches die erwähnten Forscher als Hauptrepräsentant der Pentosen enthaltenden Pflanzenharze bei ihren Versuchen angewandt haben, zuweilen mehr oder weniger aromatische Verbindungen enthielte, daß also nicht die Pentosen direkt, sondern die Oxydation der in ihnen enthaltenen, eben erwähnten Substanzen zur Bildung von Benzoesäure Anlaß geben. Ich bemerke, daß von uns darüber noch diesbezügliche Versuche angestellt werden, zumal wir ja jetzt die Möglichkeit besitzen, auch außerhalb des Tierkörpers eine Oxydation beispielsweise im Wiesenheu vorhandener aromatischer Verbindungen zu Benzoesäure zu bewirken, und uns daraus das Wirkungsvermögen in bezug auf Hippursäurebildungsfähigkeit wenigstens annähernd berechnen zu können.

Nach den Ergebnissen meiner eigenen neuesten Untersuchungen zu schließen, mußte ich zu der Ansicht gelangen, daß V. Hofmeister[2]) nur infolge der Mängel, welche die Methode hatte, nach der er zu arbeiten gezwungen war, zu keinem positiven Resultat gelangte. Denn man kann unmöglich annehmen, daß er derartige Unterschiede, wie ich sie bei meinen Versuchen erzielte, nicht erkannt hätte, es sei denn, daß er entweder durch das Kochen des Heus mit gespannten Wasserdämpfen die Hippursäure bildende Substanz unlöslich gemacht hat, oder, was mir bedeutend einleuchtender zu sein scheint, daß die Unterschiede zwischen der Hippursäurebildung nach normalem und extrahiertem Heu wegen der großen Futterreste, welche die Tiere zurückließen, nicht mehr zu erkennen waren. Daß tatsächlich Benzolderivate im Heu enthalten sind, wird in meinen bald folgenden Mitteilungen bewiesen werden, und daß diese Verbindungen nur

[1]) l. c. Bd. 49, 1898 S. 97.
[2]) l. c. Bd. 14, 1871 S. 458 ff.

äußerst schwer zu zerstören sind, leuchtet ohne weiteres ein, wenn man bedenkt, daß der Benzolring wahrscheinlich weder durch das äußerst starke Oxydationsvermögen des Tierkörpers, noch auch durch unsere künstlichen Oxydationsmittel wie Salpetersäure, Chromsäuregemisch, Kaliumpermanganat in alkalischer oder saurer Lösung, nicht einmal durch schmelzendes Kali, wenn dieses nur in genügendem Überschuß vorhanden ist, gesprengt wird. Wie viel weniger muß da Wasser auch selbst unter gespannten Dämpfen einwirken?

Hatte ich also durch Einwirkung von heißem Wasser einen Teil der Hippursäure bildenden Substanz tatsächlich gelöst, so mußte auch die Fähigkeit, Hippursäure zu bilden, wieder eintreten, wenn ich den Extrakt, der die gelösten Substanzen enthielt, verfütterte. Ich bemerkte schon, daß der Extrakt bis zur Trockene eingedampft wurde, und daß die Pillen, die dann davon hergestellt waren, von den Tieren mit großer Begierde gefressen wurden. Leider hatte ich für Untersuchungszwecke im Laboratorium eine Menge dieses Extraktes verbraucht, sodaß ich schließlich nicht mehr mit absoluter Bestimmtheit angeben konnte, wie viel Rückstand in Wirklichkeit geblieben ist. Wenn daher die in der Tabelle auf Seite 52 und 53 angeführten Versuchsreihen nicht ein Resultat ergeben konnten, wie es wünschenswert gewesen wäre, daß nämlich die durch die Extraktion gelöste Hippursäure bildende Substanz durch Zufügung einer entsprechenden Menge Extrakt wieder ersetzt wurde, so ist doch deutlich ersichtlich, daß durch die Verfütterung des Heuextraktes eine unverkennbare Steigerung in der Hippursäureausscheidung eingetreten ist.

Meine Versuchsergebnisse zeigen, daß ich zu wenig Extrakt verfüttert habe, was eben wie gesagt darin begründet ist, daß ich dessen absolute Menge nicht genau genug kannte, sondern das verbrauchte schätzungsweise in Anschlag bringen mußte. Ich bin aber fest überzeugt, daß im Wiederholungsfalle der Nachweis quantitativ geführt zu werden vermag, denn daß irgend im Gewicht fallende flüchtige Benzolderivate beim Eindampfen des Extraktes verloren gehen, glaube ich nicht, und schließlich ließe sich ja auch dieses durch geeignete Vorrichtungen vermeiden.

80 g dieses Extraktes nun wurden an das Versuchstier verfüttert. Ich muß noch bemerken, daß ich mich speziell bei diesen Versuchen mit den Ergebnissen von einem Hammel begnügen mußte, da die Herstellung noch größerer Mengen von Futtermaterial, wie ich es brauchte, in unserem Laboratorium nicht gut ohne größere Schwierigkeiten möglich war. Aber die Resultate sind wohl, wie ich annehme, so beweiskräftig, daß kein Zweifel an ihnen gehegt werden kann, und ich habe der größtmöglichsten Sicherheit wegen die Perioden so weit ausgedehnt, so lange eben das Futter reichte, resp. wie später zu bemerken ist, so lange der Hammel, der immer am besten gefressen hatte, seine Schuldigkeit tat. In Rücksicht auf die geringe Quantität geeigneten Futtermaterials mußte ich schon nach dreitägiger Vorfütterung mit Pillen die Untersuchung des Erfolges derselben beginnen. Aber dieser war bereits voll und ganz da, wie es ja auch eigentlich gar nicht anders zu erwarten war. Denn wurde die durch Extraktion mit Wasser dem Heu entzogene Hippursäure bildende Substanz später in derselben leicht aufnehmbaren Form, wie man wohl annehmen kann, zum ursprünglichen Futter zugefügt, so mußte die Hippursäurebildungsfähigkeit auch naturgemäß gesteigert werden. Dieses geschah denn auch, und sowohl nach der Hennebergschen wie nach unserer Methode ergaben die Zahlenresultate die gleichmäßige Steigerung der Hippursäureausscheidung. Während das extrahierte Heu im Mittel von neun Versuchstagen 7,6588 g Hippursäure im Harn geliefert hatte, waren jetzt im Mittel von sechs Versuchstagen 10,4582 g nachweisbar und zwar so, daß die einzelnen Tagesuntersuchungen nur minimal von einander abweichen, zum Zeichen, daß die in den Pillen enthaltene Hippursäure bildende Substanz sehr schnell vom Tierkörper resorbiert und zu Benzoesäure resp. Hippursäure verarbeitet wird. Was mich zwar überraschte, aber schließlich nicht weiter auffallend ist, war das, daß bei dem Versuch mit extrahiertem Heu sämtliche im Harn ausgeschiedene Schwefelsäure Ätherschwefelsäure war. Es ist eben sehr leicht damit erklärt, daß die Sulfate des Heus quantitativ durch die Behandlung desselben mit Wasser gelöst sind, und nur die aus den Zufallprodukten des Eiweißes sich bildenden Ätherschwefelsäuren im

Harn zur Abscheidung gelangen. Was mich aber überraschen mußte, und was nicht ohne weiteres erklärlich war, war der Umstand, daß die ausgeschiedene Ätherschwefelsäure höher war, als die Gesamtschwefelsäure, und das konnte, wie sich auch im Laufe meiner Untersuchungen herausstellte, nur an der Methode liegen. Entweder wurde daher bei der Bestimmung der Gesamtschwefelsäure zu wenig, oder bei der Bestimmung der Ätherschwefelsäure zu viel gefunden, und letzteres war, wie ich in folgendem zu beweisen haben werde, der Fall.

Die Untersuchungen der ersten vier Tage hatten folgende Resultate ergeben:

	1.	2.	3.	4.
Gesamt-Schwefelsäure:	0,0634 0,0629	0,0571 0,0578	0,0592 0,0579	0,0600 0,0591
Äther-Schwefelsäure:	0,0723 0,0736	0,0587 0,0597	0,0630 0,0653	0,0707 0,0699

g $BaSO_4$

Wenn auch die Differenzen nicht immer so sehr groß sind, ist doch in allen Fällen ein Plus an Ätherschwefelsäure zu konstatieren. Ich erkläre mir diese Erscheinung so: Durch das von Salkowsky vorgeschriebene Chlorbaryumgemisch entsteht erstens infolge eines großen Überschusses von Chlorbayrum ohnehin, dann aber auch durch das aus nicht gebundenen Baryumhydroxyd und dazu kommender Salzsäure gebildete ein ganz gewaltiger Überschuß von Bayrumchlorid. Wir wissen jedoch aus Erfahrung, daß bei der Schwefelsäurebestimmung jeglicher größere Überschuß von Bayrumchlorid vermieden werden muß, weil letzteres von dem Bayrumsulfat mechanisch eingeschlossen wird, und dann auch durch sorgfältigstes Auswaschen nicht mehr davon zu trennen ist. Meine eben erwähnten Bestimmungen aber, bei welchen nur geringe Mengen von Bayrumsulfat zur Wägung gelangen, leiden durch diese Fehlerquelle, wie wohl leicht ersichtlich, an dem Übelstande, daß sie in allen Fällen zu hohe Werte geben, und es mußte infolgedessen meine Aufgabe sein, diese Fehlerquelle zu vermeiden, wenngleich es nicht gerade in direktem Bezuge zu dem Thema meiner Arbeit steht. Ich stellte mir nun zunächst eine Chlorbayrummischung her, die nicht er-

heblich mehr Chlorbayrum enthielt, als zur Ausfällung der in dem Harn enthaltenen Schwefelsäure erforderlich war. Wenn ich sodann den Harn mit dem Chlorbayrumgemisch versetzt hatte, leitete ich solange einen kontinuierlichen Kohlensäurestrom durch die Flüssigkeit, bis die durch Zusatz einiger Tropfen Phenolphtalein entstandene Rotfärbung verschwunden war, ich also annehmen konnte, daß sämtliches überschüssiges Baryumhydroxyd durch die Kohlensäure neutralisiert war. Alsdann verfuhr ich nach der alten Salkowskyschen Vorschrift weiter. Zur Kontrolle bestimmte ich jedoch im weiteren Verlaufe meiner Untersuchungen die Gesamtschwefelsäure einerseits, dann die Ätherschwefelsäure neben der Salkowskyschen unveränderten Methode auch nach der mit eben dieser Modifikation versehenen und ich glaube, daß die mit dieser Abänderung gewonnenen Resultate der Wirklichkeit näher kommen. Denn, wenngleich ich es, wie ich schon betonte, für nicht absolut ausgeschlossen halte, daß sämtliche Sulfate durch die Behandlung des Heus mit Wasser in Lösung gehen, braucht es noch nicht mit Bestimmtheit der Fall zu sein, und nach meinen Ergebnissen halte ich es für sehr gut möglich, daß die Bestimmung der Ätherschwefelsäuren nach der Salkowskyschen Methode zu hohe Resultate gibt. Wo große Unterschiede zwischen der Gesamt- nnd den Ätherschwefelsäuren bestehen, mag ja der Fehler nicht so sehr ins Gewicht fallen und sich wohl durch die Vergleichsresultate ausgleichen, wo aber, wie speziell bei meinen Analysen, nur sehr wenig Gesamtschwefelsäure ausgeschieden wird, sodaß sich nach vorgeschriebener Bestimmungsart die Ätherschwefelsäuren höher stellen wie die Gesamtschwefelsäure, muß die Methode modifiziert werden. Ob nun meine durch die von mir angebrachte Modifikation gewonnenen Ergebnisse richtig sind, kann ich noch nicht mit voller Bestimmtheit behaupten, jedenfälls scheinen sie doch der Wahrscheinlichkeit schon erheblich näher zu kommen. Immerhin ist es die Pflicht des Analytikers alle Fehler nach Möglichkeit zu vermeiden, wenn diese dazu irgend gegeben ist. Ich will hier die Fortsetzung der Periode mit den drei Analysenbefunden neben einander der besseren Übersicht wegen folgen lassen; und zwar vom 6., 7. und 8. Untersuchungstage.

Gesamtschwefelsäure[1])	0,0722	0,0729	0,0666
	0,0741	0,0727	0,0656
Ätherschwefelsäuren S.[1])	0,0702	0,0748	0,0700
	0,0690	0,0770	0,0697
Ätherschwefelsäuren S.[1]) mit Modifikation	0,0496	0,0695	0,0492
	0,0513	0,0675	0,0485
	g $BaSO_4$		

Wie bereits erwähnt, wage ich es noch nicht, diese Ergebnisse als unbestreitbar richtig aufzustellen, trotzdem die gefundenen Zahlen überraschend gut übereinstimmen, sondern ich werde später noch einmal einschlägige Versuche unternehmen, um diese Frage absolut klar zu stellen.

Etwas, was mir noch im Laufe dieser Periode mit extrahiertem Heu aufgefallen ist und was ich wenigstens nicht ganz unerwähnt lassen möchte, ist, daß die Alkaleszenz des Harnes, die anfangs ganz rapide abnahm, gegen Ende der Periode sich langsam wieder steigerte, ein physiologischer Vorgang, für den ich aber keine Erklärung gefunden habe. Als ich dann wieder in der nun folgenden Versuchsreihe den getrockneten Heuextrakt in Form von Pillen verfütterte, stieg, wie vorauszusetzen war, die Ausscheidung der Gesamtschwefelsäure wieder auf ein Normalmaß; ich setzte aber trotzdem die Untersuchung der Ätherschwefelsäure bei dieser und auch noch bei der folgenden Periode, auf die ich gleich noch näher einzugehen habe, sowohl nach der Salkowskyschen Methode, als auch mit meiner dabei angebrachten Modifikation fort und erzielte genau dieselben Resultate wie vorher. Da es ja aber bei diesen meinen Versuchen nicht so sehr auf ein Resultat von äußerster Genauigkeit, als auf ein Vergleichsergebnis ankommt, habe ich in der hiefür aufgestellten Tabelle alle Versuchsergebnisse eingereiht.

Während dieser Versuche konstatierte ich nebenbei auch, daß bei Darreichung der von mir angewandten Futtermittel in frischem Harn keine freie Benzoesäure ausgeschieden wird. Ich sammelte die nach Henneberg bestimmte Hippursäure von sämtlichen Perioden getrennt und extrahierte dieselbe 36 Stunden

[1]) Bezogen auf 50 cc des auf 1000 ccc aufgefüllten Harns.

lang im Soxhlet mit säurefreiem Petroläther. Bei der Titration desselben nach der Extraktion unter Zusatz von Alkohol genügten 2—3 Tropfen $^1/_6$ Normal-Natronlauge mit Phenolphtalein als Indikator zur Rotfärbung, zum Zeichen, daß überhaupt kein saures Produkt, folglich auch keine Benzoesäure, in Lösung gegangen war. Eine quantitative Bestimmung etwa ausgeschiedener Benzoesäure, getrennt von Hippursäure, ist aber auch nach unserer Methode noch nicht möglich, da erstere in schwach saurer Lösung selbst bei 700 cc Destillat nicht quantitativ übergeht und man zugleich befürchten muß, daß Hippursäure gespalten wird, dagegen läßt sich wohl das Verhältnis von Benzoesäure und Hippursäure in der eben erwähnten Art, nämlich unter Anwendung der Hennebergschen Methode bestimmen, da nach früheren Versuchen von uns bei genügend langer Extraktionsdauer eine quantitative Trennung der Hippursäure von der Benzoesäure erzielt wird.

Ich habe also bereits klar gestellt, daß ein großer Teil der Muttersubstanz der Hippursäure in Wasser löslich ist. Es fehlte nun noch, die Bestätigung der Weiskeschen Untersuchungen[1]) zu erlangen, auf Grund deren die Hippursäure nach Behandeln des Heus mit verdünnter Schwefelsäure (1,5 %) vollständig oder doch wenigstens bis auf quantitativ nicht mehr nachweisbare Spuren aus dem Harne verschwindet. Ich mischte daher 10 kg des Heus, mit dem ich schon meine letzten Versuche gemacht hatte, mit ca. 100 Liter heißem Wasser, ließ unter häufigem Rühren das Gemisch 24 Stunden stehen, preßte das Wasser mit einer Presse so gut als möglich ab, und behandelte das Heu nunmehr mit 50 l einer verdünnten Schwefelsäure (1,5 %), ließ abermals 24 Stunden stehen, und wusch die Säure mit kaltem Wasser aus, bis der abgepreßte Saft mit Congorot keine Säurereaktion mehr gab. Daß das Versuchstier sich standhaft weigerte dieses Futtermittel zu sich zu nehmen, ist wohl leicht verständlich. Deshalb sind die Versuchsergebnisse, welche ich während dieser Periode, die nur — da ich ja, wie vorauszusehen, keine Vorfütterung riskieren konnte — 5 Tage anhielt, erzielte, keineswegs einwandsfrei, nur scheinen sie nicht gerade auf das Ziel hinzustreben, welches

[1]) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 12, S. 261.

Weiske seiner Zeit erreicht hat, nämlich die Hippursäure im Harn zum Verschwinden zu bringen. Wenngleich ich auf eine fast unerklärliche Weise auch hier nach unserer Methode bedeutend höhere Zahlen, die Hippursäureausscheidung betreffend, erzielte, konnte ich nach der Hennebergschen Methode doch immer noch 3,57 bis 5,70 g Hippursäure pro Tag nachweisen, trotzdem vom ersten Tage an ganz bedeutende Futterreste zu verzeichnen waren. Soviel läßt sich daher aus meinen Versuchsergebnissen mit Sicherheit schließen, daß die Weiskeschen Resultate zum mindesten von der Individualität der Versuchstiere abhängen, denn der Hammel, den ich für meine Versuchszwecke benützte, schied auch während der Fütterung des mit Schwefelsäure extrahierten Heus nach unserer Methode bestimmt immerhin noch 5,40 bis 7,94 g Hippursäure pro Tag aus, obwohl bereits

am 2. Tage 121 g
„ 3. „ 95 „
„ 4. „ 350 „
„ 5. „ 260 „

Futterreste zu konstatieren waren. Ich möchte mich daher mehr zu dem Schluß neigen, daß zwar durch meine Versuchsergebnisse diese Frage noch nicht definitiv entschieden ist, daß man aber mit ziemlicher Bestimmtheit annehmen darf, daß kalte, verdünnte Schwefelsäure beim Heu nach einer vorherigen Behandlung desselben mit heißem Wasser nur noch unwesentliche Mengen der Substanzen zu lösen vermag, welche die Bildung der Benzoesäure im Tierkörper veranlassen. Eine sehr merkwürdige Erscheinung ist, wie auf der Tabelle auf Seite 53 ersichtlich, die abnorme Steigerung der Stickstoffausscheidung während der Periode der Fütterung mit dem durch Schwefelsäure extrahierten Heu. Es tritt eine Steigerung des Gesamtstickstoffs von 4,22 g auf 7,08 g ein und gleichzeitig ist ein starkes Wachsen der Äther-Schwefelsäure zu bemerken, die von 0,23 g auf 0,4 g pro die zunehmen. Ich vermag mir diese Erscheinung nicht anders zu erklären, als daß der Hammel offenbar bei Zurücklassung so bedeutender Futterreste gehungert und infolge davon wohl von seinem eigenen Körpereiweiß, vermutlich dem Zirkulationseiweiß, gezehrt hat. Wenigstens spricht die anfangs gesteigerte, dann wieder ab-

nehmende Stickstoffausscheidung, sowie die Vermehrung der Äther-Schwefelsäure für einen gesteigerten Zerfall von Eiweiß, welches der Hammel nicht aus dem dargereichten Futter zu nehmen vermochte. Nichtsdestoweniger aber sinkt die Hippursäureausscheidung beständig weiter, ein Beweis also wieder für meine frühere Behauptung, daß die Beihilfe der aromatischen Zerfallprodukte der Eiweißkörper bei der Bildung von Hippursäure nur eine verhältnismäßig untergeordnete Rolle spielt im Vergleich zu den Hippursäure bildenden Substanzen des Wiesenheus und des Cerealienstrohs.

Hatte ich bis jetzt mit der Verfütterung verschiedener Substanzen Resultate erzielt, welche im direkten Gegensatz standen zu den bisherigen Ansichten, welche auf Grund der Methoden von Henneberg, Bunge-Schmiedeberg und anderer Forscher aufgestellt waren, so mußte ich der vollständigen Klärung wegen nunmehr sehen, ob Kleeheu, also ein Futtermittel, welches nach bisherigen Versuchen nur geringe Mengen von Hippursäure zu bilden vermochte, nach unserer neuen Methode etwa auch ganz andere Zahlen ergab. Ein kurzer nur nebenbei gemachter Tastversuch, bei welchem nur die Hippursäure bestimmt wurde, zeigte dagegen, daß Kleeheu in der Tat erheblich geringere Mengen von Hippursäure erzeugt, als z. B. Wiesenheu, daß man also im Kleeheu eventuell ein Futtermittel hat, welches nur geringe aromatische Produkte enthält, aus denen Benzoesäure hätte entstehen können. Ich fütterte einen zweiten Hammel, den ich ja während der Versuche mit extrahiertem Heu etc. nicht brauchte, mit 800 g Kleeheu und 50 g Weizenschalen und erzielte nach dreitägiger Vorfütterung folgende Zahlenergebnisse:

1. pro die g Hippursäure: 4,3130
2. „ „ „ „ 3,8383
3. „ „ „ „ 3,7459
4. „ „ „ „ 3,6310

Kontrollbestimmungen nach Henneberg am ersten, zweiten und vierten Tage ergaben:

1. pro die g Hippursäure: 2,1290
2. „ „ „ „ 2,8575
4. „ „ „ „ 2,7975

Aus diesen Parallelbestimmungen läßt sich bereits schließen, daß zwar nicht ganz so wenig Hippursäure bei Kleeheufütterung ausgeschieden wird, wie es nach der Hennebergschen Methode der Fall zu sein scheint, daß trotzdem aber ein bedeutendes Sinken in der Ausscheidung stattfindet. Für diese Erscheinung muß es auch eine Erklärung geben, die jedoch bis jetzt noch nicht gefunden zu sein scheint. Es sind nur 2 Fälle möglich; es könnten erstens im Kleeheu in der Tat keine oder doch nur geringe Mengen aromatischer Substanzen enthalten sein, und aus diesem Grunde wäre die Bildung der Hippursäure auf ein Mindestmaß herabgedrückt. Es liegt jedoch nach den allgemeinen Naturgesetzen gar kein berechtigter Grund für diese Annahme vor, denn wenn auch die Vegetationsbedingungen für Gramineen und Leguminosen verschiedene sind, ist es doch wunderbar, daß die einen befähigt sein sollen, aromatische Substanzen zu bilden, die anderen nicht. Trotzdem aber zeigt das Kleeheu in bezug auf Hippursäure-Bildungsfähigkeit so gewaltige Unterschiede gegenüber dem Wiesenheu, daß wirklich der Gedanke nahe lag, im Kleeheu seien keine oder weniger Verbindungen der aromatischen Reihe vorhanden. Jedoch läßt sich vielleicht noch eine zweite Möglichkeit annehmen, daß nämlich im Kleeheu auch wohl größere Mengen aromatischer Substanzen enthalten seien, daß diese aber deshalb nicht zur Hippursäure-Bildung beitragen können, weil sie unverdaulicher Natur sind. Es galt nun, um diese Möglichkeit zu fixieren, eine Methode ausfindig zu machen, nach der sich ev. die Gesamtmenge der aromatischen Körper im Futtermittel, und die unverdaut ausgeschiedenen im Kot bestimmen ließen.

Ich ging bei meinen Versuchen nicht, wie Stutzer[1]) in seiner bereits in der Einleitung zitierten Arbeit davon aus, etwaige Benzolderivate in der Rohfaser nachzuweisen, sondern in dem betreffenden Futtermittel, da ich ja bereits zu dem Resultat gelangt war, daß die Muttersubstanz der Hippursäure zu einem großen Teile in Wasser löslich ist, also auch bei Kleeheu und anderen Futtermitteln wenigstens ein Teil wasserlöslich sein kann. Sollte es mir aber gelingen, ein Resultat zu erreichen, so mußte

[1]) Landw. Versuchsst. Bd. 18, S. 364 ff.

ich ein Oxydationsmittel anwenden, welches erstens stark genug war, eine vollständige Oxydation herbeizuführen, dann aber gestattete, das Oxydationsprodukt quantitativ zu bestimmen. Es standen mir zwei Wege offen, einmal die Oxydation mit schmelzendem Kali, oder, was ich schließlich vorzog, die Oxydation mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung. In alkalischer Lösung mußte ich auf alle Fälle arbeiten, um etwa entstehende flüchtige aromatische Säuren sofort zu binden. Wollte ich für meine Versuche die Oxydation in der Kalischmelze wählen, so mußte ich den Oxydationsvorgang so lange fortsetzen, bis ich alle aromatischen Körper in Oxybenzoesäure, also Salizylsäure, übergeführt hatte. Es läßt sich aber nur schwer eine Grenze ziehen, wann die Reaktion beendet ist. Ich versuchte daher lieber eine Oxydation mittels Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung, die sich vorzüglich bei einiger Übung und nötiger Vorsicht quantitativ ausführen läßt, und die mich auch zu umso befriedigenderen Resultaten führte, weil ich dabei als Endprodukt fast chemisch reine Benzoesäure erhielt, denn die Elementaranalyse des Oxydationsproduktes ergab Zahlen, die, wie ich später zeigen werde, nur unerheblich von dem für Benzoesäure berechneten Wert für C und H abweichen. Also[1]) z. B. 40 g Wiesenheu, Kleeheu oder irgend ein anderes Futtermittel werden in einer Porzellanschale, selbstverständlich im fein gemahlenen Zustande, mit einer verhältnismäßig concr. Kalilösung aufgenommen und auf dem Wasserbade, oder bei vorsichtigem Arbeiten auch über freier Flamme erwärmt. Alsdann fügt man so lange fein gepulvertes Kaliumpermanganat (natürlich auch mit nötiger Vorsicht, um eine allzu heftige Oxydation zu vermeiden) hinzu, bis das Flüssigkeitsgemisch auch nach längerem Stehen die rote Färbung des Kaliumpermanganats nicht mehr verliert. Nun versetzt man so lange mit Alkohol, bis die Flüssigkeit beim Filtrieren farblos abläuft, um das überflüssige Kaliumpermanganat zu reduzieren. Schließlich filtriert man vom Braunstein ab und wäscht mit heißem Wasser so lange aus, bis das Waschwasser nicht mehr alkalisch reagiert und dampft das Filtrat bis auf ca. 100 cc ein.

[1]) Nach Gattermann, Die Praxis des organischen Chemikers, 1898, dritte Auflage, S. 280.

Dieses Filtrat enthält, wie ich noch später analytisch belegen werde, die zu Benzoesäure oxydierten Benzolderivate des betreffenden Futtermittels, und braucht daher nur nach unserer Hippursäure-Bestimmungsmethode destilliert zu werden, um die Benzoesäure darin zu bestimmen. Selbstverständlich ging der quantitativen Bestimmung eine große Anzahl qualitativer Tastversuche voraus, da ich doch überhaupt erst einmal konstatieren mußte, ob sich tatsächlich Benzoesäure bildete. Ich schüttelte also das Destillat mit Petroläther aus und untersuchte die Petrolätherlösung auf Benzoesäure. Durch Fällen mit Eisen-, Kupfer- und Zinnsalzen stellte ich die verschiedenen Benzoate her. Voraussetzung dabei ist, daß man in absolut neutraler Lösung arbeitet. Ich nahm daher den Petrolätherauszug mit Alkohol auf und titrierte die Lösung unter Zusatz von Phenolphtalein als Indikator mit Natronlauge. Setzte ich nun zu der neutralen Salzlösung einige Tropfen Eisenchlorid, Kupfersulfat oder Zinnsulfat, so fiel benzoesaures Eisen, Kupfer oder Zinn prachtvoll aus. Ich kann jedoch nicht verhehlen, daß ich auch jedesmal, wenn auch schwach, doch deutlich erkennbar die Salizylsäure-Reaktion erhielt, also ein Zeichen, daß sich bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat auch Spuren von Salizylsäure bilden. Meine Methode, die Benzolderivate in Futtermitteln in Form von Benzoesäure zu bestimmen, macht ja aber auch vorläufig noch nicht den Anspruch absoluter quantitativer Genauigkeit, sondern die Bestimmungen, wie ich sie bei der Untersuchung der verschiedenen, Benzolderivate enthaltenden Substanzen wie Heu, Klee, Eiweiß, Fäces gemacht, sollen vorläufig nur Vergleichsbestimmungen sein. Ich behalte mir jedoch vor, eventuell später noch den absolut quantitativen Nachweis zu führen. Um zunächst zu sehen, ob ich einigermaßen gut übereinstimmende Resultate erzielen würde, oxydierte ich 4mal 30 g Wiesenheu in der angegebenen Weise. Das nach unserer Hippursäure-Bestimmungsmethode erhaltene Destillat von 450 cc behandelte ich zur Austreibung der natürlich in großen Mengen vorhandenen Kohlensäure im kontinuierlichen Wasserstoffstrom, neutralisierte mit NaOH, dampfte ein und brachte es in unsere Kölbchen von 50 cc Inhalt, setzte 10 cc der titrierten Schwefelsäure zu und stellte

die Kölbchen längere Zeit in den Eisschrank. Schon nach Verlauf weniger Stunden hatte sich ein deutlich sichtbarer Niederschlag von Benzoesäure gebildet, die auch schon im Destillat in sehr schönen weißen Blättchen in Erscheinung trat. Der Niederschlag vermehrte sich nach längerem Stehen zusehens, und als ich nach 48 Stunden die zur Bestimmung nötige Titration in der abfiltrierten Lösung ausführte, erhielt ich verhältnismäßig gut stimmende Resultate, 60 cc Gesamtflüssigkeit waren vorhanden, hiervon nahm ich nach der Filtration 50 cc zur Titration. Ich hatte jedoch nicht sämtliche 4 Bestimmungen zu gleicher Zeit fertig und mußte daher erklärlicherweise verschiedene Temperaturen im Eisschrank beobachten. Die Titration der beiden ersten Bestimmungen ergab bei einer Temperaturbeobachtung von 3° C einen Verbrauch von 32,54 und 32,08 cc NaOH, die zweite Serie bei $^1/_2$° C von 31,42 cc und 31,50 cc NaOH. Zu den verbrauchten cc NaOH ist, da ich von 60 cc nur 50 cc anwandte, noch $^1/_5$ der Anzahl hinzuzählen und dann die Summe von 45,12 cc, nämlich der Vorlage (10 cc H_2SO_4 = 45,12 cc NaOH), abgezogen werden. Die Differenz entspricht dann der ausgeschiedenen Menge Hippursäure. Ich habe bei meinen Analysenberechnungen nun auch des besseren Verständnisses und der Einfachheit halber immer den Befund auf Hippursäure umgerechnet, d. h. ich habe dann in der betreffenden Substanz festgestellt, wieviel Hippursäure im Tierkörper gebildet zu werden vermag, wenn alle die aromatischen Produkte auch im Organismus oxydiert werden, die durch die künstliche Oxydation mit Kaliumpermanganat zu Benzoesäure übergeführt werden und ich werde der Einfachheit und der besseren Übersicht halber auch bei meinen späteren Ergebnissen immer von diesem sogenannten Hippursäure-Bildungswert der verschiedenen Futtermittel sprechen. Der Faktor für einen cc NaOH ist aber 0,0385, d. h. 1 cc NaOH = 0,0385 g Hippursäure. Infolgedessen ergeben die 4 Parallelbestimmungen folgendes Ergebnis:

titrierte C_6H_5COOH	0,23370	0,25487	0,28567	0,28182 g
Lösungscoeff. bei	3° 0,1531	b. 3° 0,1531	b. $^1/_2$° 0,1404	b. $^1/_2$° 0,1404
	0,38680 g	0,40797 g	0,42607 g	0,42222 g

i. M. 0,41052 g Hippursäure.

Diese Zahlen stimmten für den Anfang, wo ich mit meiner Methode noch ungeübt war, ganz leidlich, da ich aber nicht das an die Tiere verfütterte Heu benutzt hatte, mußte ich auch mit diesem einen Versuch machen, um zu sehen, wie viel Hippursäure bildende Substanz sich darin finden würde. Denn wenn ich die gefundenen Zahlen etwa auch bei dem verfütterten Heu wiederbekommen würde, so hätte ich mir sagen müssen, daß zwar durch gleichmäßiges Arbeiten ein verhältnismäßig gut stimmendes Resultat erzielt sei, aber durch die Oxydation mit Kaliumpermanganat noch nicht alle die im Tierhörper oxydierten aromatischen Produkte in Benzoesäure übergeführt seien. Die gefundenen Zahlen auf eine Tagesration von 700 g pro Tier umgerechnet ergaben eine Hippursäuremenge von 9,5788 g, während ich mit unserem normalen Wiesenheu 11 bis 12 g im Durchschnitt gefunden hatte. Die Untersuchung von 4×30 g Wiesenheu von der Periode, wie es bei der Zulage von Fleischmehl gebraucht war, ergab aber tatsächlich höhere Werte, nämlich einer Tagesausscheidung von 12,0297 g Hippursäure entsprechend, während die Bestimmung der Hippursäure im Harn im Mittel von zwei Versuchstieren 11,6421 g betrug. Die Zahlenwerte der einzelnen Analysen entsprachen bei Anwendung von 30 g Heu 0,4970 g, 0,5342 g, 0,5342 g, 0,5156 g Hippursäurebildungswert. Man sieht, die Bestimmung der Hippursäure im Heu ist tatsächlich noch etwas höher als im Harn, und man könnte vielleicht daraus schließen, daß sämtliche aromatischen Produkte die Benzoesäure resp. später Hippursäure zu bilden vermögen, sowohl durch die Oxydation mit Kaliumpermanganat zu Benzoesäure übergeführt sind, als auch im Organismus zu Hippursäure verarbeitet werden. Ich zweifelte jedoch an diesem Schlusse, als ich bei der pualitativen Untersuchung einer Kotprobe ebenfalls Benzoesäure durch Fällen mit Eisen-, Kupfer- oder Zinnsalzen nachzuweisen vermochte.

Ich setzte daher sofort 4×40 g Kot, der während der Normalperiode mit Wiesenheufütterung gesammelt war, zur Oxydation an, konnte zwar in jedem einzelnen Falle wieder den qualitativen Nachweis von Benzoesäure, also auch der Ausscheidung von aromatischen Produkten im Kot erbringen, eine quantitative Bestimmung

jedoch war nicht möglich, wenigstens sind die Resultate von 10 Bestimmungen so schwankend und ergeben auch nur so wenig positiven Anhalt, daß die Analysenfehler oft größer als die Menge der gefundenen Benzoesäure sein dürften. Es wird daher wohl das Resultat dieser Untersuchungen so aufzufassen sein, daß im normalen Wiesenheu so gut wie alle aromatischen Verbindungen zu Benzoesäure oxydiert und als Hippursäure abgeschieden werden, daß nur Spuren im Organismus nicht resorbiert werden und schließlich als unverdaulich im Kot den Tierkörper verlassen. Mit voller Bestimmtheit jedoch läßt sich auch dieses vorläufig noch nicht behaupten, weil ich noch nicht die Garantie übernehmen kann, daß durch meine Oxydations- resp. Bestimmungsmethode sämtliche Gruppen der aromatischen Reihe, wie sie in Futtermitteln enthalten sind, zu Benzoesäure oxydiert werden.

Daß man aus Eiweiß, ja sogar aus Leim, in dem jetzt noch keine bestimmten Benzolderivate nachgewiesen werden konnten, bereits vor langer Zeit Benzoesäure dargestellt hat, habe ich ja im Laufe dieser Arbeit bereits erwähnt. Ich versuchte nun ebenfalls mit Hilfe meiner Methode die aromatischen Gruppen des Eiweißes zu Benzoesäure zu oxydieren und eventuell eine quantitative Bestimmung der entstandenen Benzoesäure zu erzielen. Schon bei der Destillation konnte ich bemerken, daß ganz erhebliche Mengen dieser Säure überdestillierten und sich prachtvoll in schneeweißen Blättchen aus dem wasserklaren Destillat abschieden. Nach der Ausfällung im Kölbchen ergab denn auch die Titration sehr schön übereinstimmende Zahlen, sodaß ich hoffe, daß wegen der verhältnismäßig leichten Oxydirungsfähigkeit der aromatischen Eiweißgruppen, die Oxydation auch eine vollständige gewesen ist. Den definitiven Beweis kann ich jedoch auch hierbei jetzt noch nicht erbringen.

Im Mittel von vier Bestimmungen, bei denen pro Analyse 40 g Fleischmehl verwandt wurden, erhielt ich eine Menge von aromatischen Substanzen in Form von Benzoesäure, welche fähig ist, 0,2531 g Hippursäure zu bilden; die einzelnen Analysenergebnisse waren: 0,2499 g, 0,2563 g, 0,2511 g, 0,2551 g Hippursäure entsprechend. Auf die verfütterten 200 g Fleischmehl um-

gerechnet würde das also ergeben eine Benzoesäuremenge, welche 1,2655 g Hippursäure zu erzeugen vermöchte. Nun betrug bei der Grundfutterperiode mit Wiesenheu die Ausscheidung im Mittel sämtlicher Untersuchungen mit zwei Versuchstieren 11,6421 g, bei Zulage von Eiweiß aber 12,4223 g Hippursäure. Wir sehen also auch hier, daß fast sämtliche Substanz die nach der künstlichen Oxydation zu Benzoesäure oxydiert zu werden vermag, auch im tierischen Organismus zur Oxydation gelangt, resp. umgekehrt, denn im günstigsten Falle hätte sich die Hippursäureausscheidung bei Zulage von Eiweiß auf 12,9076 g, also noch nicht 0,5 g mehr, steigern können. Und in der Tat ist es mir auch bei dem während der Periode mit Fleischmehl gesammelten Kot nicht gelungen, eine quantitative Bestimmung der durch Oxydation erzeugten Benzoesäure zu erhalten. Qualitativ dagegen war der Nachweis wieder sehr deutlich, jedoch scheint die Menge so gering zu sein, daß bei einem Volumen von 60 cc Fällungsflüssigkeit keine Ausscheidung mehr stattfindet und kleinere Volumina lassen sich auch wieder nicht gut anwenden, da sonst die doch immerhin in erheblichen Mengen angesammelten Salze nicht vollständig in Lösung gehalten werden.

Ich habe bereits erwähnt, daß ich auch mehrfach während der verschiedenen Perioden den Harn oxydierte und dann eine Benzoesäure- resp. Hippursäurebestimmung darin machte, um zu sehen, ob ev. hier aromatische Produkte ausgeschieden werden, die noch nicht zu Benzoesäure oxydiert sind, dagegen ergaben sämtliche Analysen dieser Art, wie aus der zugehörigen Tabelle ersichtlich fast vollständige Übereinstimmung mit der direkten Bestimmung der Hippursäure, ein Zeichen, daß also alle Körper der aromatischen Reihe, die einmal bis zur Bildungsstätte der Hippursäure gelangt sind, zu Benzoesäure oxydiert sind.

Bei der Oxydation des Harns machte ich die Beobachtung, daß, trotzdem bei Harnhippursäurebestimmungen im normalen Harn das Destillat immer vollständig farblos abläuft, hier eine verhältnismäßig starke Gelbfärbung auftrat, obwohl die vom Braunstein abfiltrierte Flüssigkeit absolut farblos war, und erst beim Eindampfen einen schwach gelblichen Ton annahm. Die Ausscheidung der Benzoesäure aber war immer prachtvoll weiß,

obwohl der gelbe Ton nach der Abscheidung derselben im Kölbchen blieb. Ich versuchte bei diesen Bestimmungen die oxydierte Masse gleich ohne Filtration zu destillieren, es bildete sich aber durch die Einwirkung der Schwefelsäure auf die Chloride des Harns und die dadurch entstehende Salzsäure, die hinwieder durch weitere Zusammenwirkung mit Braunstein freies Chlor erzeugte, letzteres in solchen Mengen, daß man im freien Laboratorium ohne Abzug gar nicht hätte arbeiten können, und deshalb wohl die nicht unerhebliche Mühe des Filtrierens, Auswaschens und Wiedereindampfens vorzuziehen war. Außerdem wäre es auch nicht unmöglich, daß Chlor in solchen Mengen in statu nascendi zerstörend auf die Benzoesäure einwirken könnte.

Nunmehr mußte also noch ein Fütterungsversuch mit Kleeheu folgen, zumal, wie ich gleich noch zeigen werde, die Oxydation von Kleeheu ziemlich große Mengen von Benzoesäure lieferten, obwohl bei den vor kurzem beschriebenen Tastversuchen mit Kleeheufütterung nur ziemlich geringe Mengen Hippursäure im Harn zur Abscheidung gelangten. Im Mittel von wieder vier Bestimmungen, die sehr gut untereinander stimmende Zahlen ergaben, ließ sich berechnen, daß im Harn pro Tag 5,6397 g Hippursäure ausgeschieden werden mußten, wenn alle Gruppen der aromatischen Reihe, die durch Oxydation mit Kaliumpermanganat in Benzoesäure übergeführt werden, auch im Tierkörper dieselbe Umbildung erfahren würden. Die vier Einzelbestimmungen der Benzoesäure, resp. des Hippursäurebildungsvermögens im Kleeheu ergaben folgende Zahlen: 0,2399 g, 0,2435 g, 0,2303 g, 0,2331 g auf Hippursäure umgerechnet. Es waren aber damals bei Verfütterung von 800 g Kleeheu nur wenig über 3 g Hippursäure im Harn pro Tag zu konstatieren gewesen, folglich war anzunehmen, daß Kleeheu wohl auch eine größere Menge Benzolderivate enthält, die jedoch im Organismus nicht zur Resorbtion gelangen und daher unverdaut im Kot ausgeschieden werden mußten.

Wie aus der nächsten Tabelle ersichtlich ist, betrug die Durchschnittsausscheidung der Hippursäure im Harn während der Fütterung mit Kleeheu pro Tag 2,187 im Mittel von zwei Tieren. Zur Verfütterung gelangten als Tagesration für jedes

Tier 700 g Kleeheu, dem 50 g Weizenschalen[1]) und 10 g Kochsalz hinzugefügt wurden. Diese hatten jedoch bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat eine Benzoesäuremenge geliefert, die befähigt gewesen wäre, 5,6397 g Hippursäure, also 3,2824 g mehr als im Harn ausgeschieden war, zu bilden. Es läßt sich daher nur annehmen, wenngleich allem Anschein nach tatsächlich ja die Hippursäure bildungsfähige Substanz bedeutend geringer im Kleeheu wie im Wiesenheu ist, daß dieselbe im ersteren in ganz erheblich schwerer verdaulichen Form enthalten ist als im letzteren, daß deshalb eine Untersuchung des Kotes auf etwa darin enthaltene aromatische Substanzen unter normalen Verhältnissen zu einem Resultat führen mußte. Der während der ganzen Periode in aliquoten Teilen gesammelte Kot wurde demnach nach der Trocknung staubfein gemahlen und nun zur Bestimmung der darin enthaltenen Benzolderivate mit Kaliumpermanganat, wie immer in alkalischer Lösung, oxydiert und die vier Parallelbestimmungen ergaben bei Anwendung von je 40 g lufttrocknen Kotes wieder auf Hippursäure bildungsfähige Substanz umgerechnet:

I.	II.	III.	IV.
0,3247	0,3241	0,3333	0,3309

im Mittel: 0,3283 g Hippursäure.

Im Mittel von sechs Tagen wurde nun pro Tag 274,0 g lufttrockner Kot geliefert; danach würde also im Kot an Körpern der aromatischen Reihe auf Hippursäure umgerechnet ausgeschieden sein eine Menge von 2,2489 g Hippursäure pro Tag. Wenn nun mit diesem Befunde die Differenz zwischen der im Harn ausgeschiedenen Hippursäure und der Menge von Hippursäure bildungsfähigen Substanz, die im Kleeheu in Wirklichkeit vorhanden zu sein scheint, noch nicht völlig ausgeglichen ist, so liegt das höchstwahrscheinlich teils an einer gewissen Ungenauigkeit meiner Oxydationsmethode, deren Zahlenergebnisse nicht ab-

[1]) Die Möglichkeit liegt zwar sehr nahe, daß auch in Weizenschalen Verbindungen der aromatischen Reihe enthalten sind, ich unterließ jedoch die Untersuchung, weil das verfütterte Quantum Weizenschalen so gering ist, daß durch die etwa darin enthaltenen Benzolverbindungen kein ins Gewicht fallender Fehler bedingt wird.

solut fehlerfrei sind, sondern die nur, allerdings sehr brauchbare, Vergleichszahlen ergibt. Denn wie ich später noch darzulegen haben werde, ist das Oxydationsprodukt, welches man durch die Oxydation mit Kaliumpermanganat erhält, keine chemisch reine Benzoesäure, sondern diese wird durch etwas mitgebildete Salicylsäure verunreinigt. Jedenfalls ist aber zum ersten Male der sichere Nachweis gebracht, daß auch im Kleeheu, wenngleich nicht so viel wie im Wiesenheu, aromatische Körper in größeren Mengen vorhanden sind, wie man ursprünglich anzunehmen geneigt war, daß aber ein sehr großer Teil dieser Benzolderivate unverdaulicher Natur ist, und damit kommt man zu dem vielleicht noch nicht ganz sicheren, aber doch naheliegenden Schluß, daß wahrscheinlich die Rohfaser, und speziell hiervon die inkrustierenden Substanzen, einen großen Teil der Muttersubstanz der Hippursäure ausmachen, zumal ja, wie bekannt, die Rohfaser des Kleeheus unverdaulicher ist, wie die des Wiesenheus. Immerhin ist aber auch ein Teil der Hippursäure erzeugenden Substanz, wie ja meine Versuche gezeigt haben, leicht, sogar wasserlöslich und jedenfalls nicht besonders schwer oxydierbar, sodaß der Tierkörper, der ja ein so abnorm starkes Oxydationsvermögen besitzt, die Oxydation wohl mit Leichtigkeit zustande brächte, wenn nur die Verdaulichkeit vorhanden wäre, d. h. wenn diese Stoffe in die Blutbahn gelangen könnten. Ich habe schon früher betont, daß nach Forschern wie Schönbein, Ed. Schaer, Pflüger, Salkowsky, Schmiedeberg u. a. m. auf Grund ihrer Untersuchungen das Oxydationsvermögen des Tierkörpers so groß sei, daß wir kaum ein Mittel besitzen, um dieselbe mit solcher Kraft außerhalb des Organismus nachzuahmen. Wenn man daher Kleeheu verdaulicher machen würde, indem man z. B. durch Aufschließung die Verdauungsarbeit des Tierkörpers erleichterte, so bin ich fest überzeugt, daß dadurch auch die Bildung von Benzoesäure und damit die Hippursäureausscheidung erheblich gesteigert würde, weil dann durch die größere Verdaulichkeit der Rohfaser, die dadurch ziemlich sicher erzielt wird, größere Mengen von Körpern der aromatischen Reihe, die sonst unverdaut im Kot den Tierkörper verlassen, zur Oxydation zu Benzoesäure und damit zur Bildung von Hippursäure gelangen.

Ich lasse die zu den eben besprochenen Versuchen gehörende Tabelle folgen, welche die Ergebnisse der Fütterung mit Kleeheu enthält.

VII. Periode.

700 g Kleeheu + 50 g Weizenschalen + 10 g Kochsalz.

Tag	Ges. Stickstoff g		Ges. Schwefelsäure g		Äther-Schwefelsäure g		Hippursäure n. uns. Methode g		Hippurs. nach Hennebergg	Hippurs. i. oxyd. Harn g
	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV
1	10,8009	11,0262	1,2069	1,2357	1,0083	0,9198	2,4135	2,0266	—	—
2	11,0982	10,7874	1,2285	1,2348	0,9363	0,9036	2,1882	2,1623	—	2,1999
3	10,9414	11,0622	1,2429	1,2483	0,9180	0,8253	2,3268	2,3585	2,0107	—
4	10,6883	10,8279	1,2183	1,2246	0,9210	1,0155	1,9283	2,1997	—	—
5	10,8821	10,9271	1,2348	1,2450	0,9138	0,8313	1,7897	2,2142	1,6545	1,8724
6	11,0532	10,9766	1,2174	1,2348	0,9303	0,9951	2,2922	2,3383	—	2,1885
i. M.	10,9107	10,9346	1,2248	1,2372	0,9380	0,9151	2,1565	2,2166	—	2,0869

Auch hierbei ergab wieder, wie aus der Tabelle ersichtlich, die Untersuchung des Harns bei Oxydation mit Kaliumpermanganat, daß außer Hippursäure kein Körper der aromatischen Reihe, der nicht zur Oxydation gelangt wäre, ausgeschieden werden. Ebenso war auch die Bestimmung der Gesamt- und Ätherschwefelsäure belanglos, und dieselbe mag nur zur Bestätigung schon früher gewonnener Resultate mit angegeben werden. Daß die Stickstoffausscheidung nach Fütterung von Kleeheu steigt, ist naturgemäß, und daß die Ausscheidung der Hippursäure eine sehr starke Depression selbst nach der Bestimmung mit unserer neuen Methode erfährt, hatten bereits die schon erwähnten Fastversuche ergeben, und der Grund dafür ist auch schon mit genügender Klarheit besprochen worden. Nach einer siebentägigen Vorfütterung wurde diese Periode noch auf 6 Tage mit den bereits erwähnten Untersuchungen der Ausscheidung von Gesamtstickstoff, Gesamt- und Ätherschwefelsäure und von Hippursäure nach unserer, an einigen Tagen auch nach der Hennebergschen Methode ausgedehnt. Alle Versuchsergebnisse sind von schönster Regelmäßigkeit, ein Zeichen, daß die beiden Versuchstiere sich gleichmäßig sehr schön auf die verabreichte Futterration einge-

stellt hatten. Jedoch muß ich bemerken, daß 700 g Kleeheu mit 50 g Weizenschalen eine etwas zu knapp bemessene Ration war und, wenngleich sie wahrscheinlich noch über Erhaltungsfutter steht, brauchte ich doch nicht zu zögern, bei der nächsten Periode, die ebenfalls Kleeheu als Grundfutter haben sollte, 150 g Kleeheu zuzulegen, ohne befürchten zu müssen, daß Futterreste bleiben würden. Daß auch hier wieder die Ätherschwefelsäuren in gar keiner maßgebenden Beziehung zur Ausscheidung der Hippursäure standen, findet schon darin seine Erklärung, daß durch unsere früheren Versuche bereits erwiesen ist, daß die Eiweißfäulnis keinen wesentlichen Einfluß auf die jeweilige Höhe der Hippursäureausscheidung besitzt, und ich kann nunmehr zum letzten Teile meiner Untersuchungen übergehen, nämlich einerseits darzulegen, daß doch wohl die Rohfaser aller Wahrscheinlichkeit nach diejenige Substanz ist, welche zu einem großen Teile zur Bildung der Hippursäure beiträgt, andererseits die Auffindung einer Substanz zu besprechen, die ich sowohl in Wiesenheu, wie auch in Kleeheu nachgewiesen habe, und die auch in der Tat in größeren Mengen verabreicht, eine ganz bedeutende Steigerung in der Hippursäure bewirkt hat. Was meine nicht unbegründete Vermutung, daß die Rohfaser teilweise die Muttersubstanzen der Hippursäure enthält, betrifft, so muß ich mir für weitere Versuche vorbehalten, zu erforschen, ob sich bei der Behandlung des Wiesenheus mit heißer verdünnter Kalilauge einerseits, mit heißer verdünnter Schwefelsäure andererseits, schließlich mit beiden Lösungsmitteln gemeinsam in den verschiedenen Lösungsprodukten mit Hilfe meiner Oxydationsmethode Benzolderivate nachweisen lassen.

Jetzt will ich die Darlegung meiner Untersuchungsergebnisse folgen lassen, zu denen ich bei meinen Bemühungen, wenigstens einen Körper der aromatischen Reihe aufzufinden, gelangte. Durch Herrn Dr. A. Rümpler wurde ich darauf aufmerksam gemacht, daß es Lippmann gelungen sei, in den verholzten Geweben der Runkelrübe Coniferin nachzuweisen, und es daher sehr wohl möglich wäre, daß dieser Körper auch in den Stengeln des Wiesenheus und des Kleeheus enthalten sei. Das Coniferin, ein Glucosid, findet sich allgemein im Cambialsaft der Coniferen, und

die Formel des krystallisierten Coniferins ist $C_{16}\ H_{22}\ O_8 + 2\ H_2O$ oder die Konstitutionsformel, wie sie im Beilstein angegeben ist, $CHO\ (CHOH)_4\ CH_2\ O\ C_6\ H_3\ (OCH_3)\ C_3\ H_4\ OH + 2\ H_2\ O$. Nähere Angaben finden sich u. a. in Fehlings Handwörterbuch. Hartig[1]), Kubel[2]) und Tiemann u. Haarmann[3]) haben sich mit der genaueren Untersuchung des Coniferins beschäftigt. Das Coniferin bildet nadelförmige, durchsichtige Krystalle, die sich in der Kälte wenig, leichter in der Wärme in Wasser lösen, leicht löslich in Alkohol, unlöslich in Äther sind. Die Lösung schmeckt bitter und polarisiert links. Bei längerem Stehen an der Luft verwittern die Krystalle, verlieren bei 100° ihr Krystallwasser und schmelzen bei 185°; bei noch höherer Temperatur zersetzen sich dieselben unter Verbreitung eines caramelartigen Geruchs. Coniferin wird durch Einwirkung von Emulsin in wässriger Lösung in Zucker und Coniferylalkohol gespalten, der als ein primärer Alkohol, als ein methyloxylierter, hydroxylierter Phenolallylalkohol von der Formel $C_6\ H_4\ OCH_3\ OH\ (C_3\ H_4\ OH)$ oder nach Beilstein[4]) als ein 3-Methylaether aufzufassen ist. Zu seiner Darstellung läßt man eine mit 0,4—0,6 Teilen Emulsin versetzte Lösung von 100 Teilen Coniferin in 1000 Teilen Wasser 6—8 Tage bei einer Temperatur von 25—36° stehen, bis sich das Coniferin vollständig in Zucker und in Coniferylalkohol gespalten hat, der sich in weißen krystallinischen Flocken abscheidet. Durch Ausschütteln der ganzen Masse mit Äther und durch Abdunsten des letzteren erhält man den Alkohol in weißen geruchlosen Krystallen, der sich kaum in kaltem, nur schwer in heißem Wasser löst, dagegen verhältnismäßig leicht in Alkohol, sehr leicht löslich in Äther ist. Sein Schmelzpunkt liegt zwischen 73 und 74°. Diese Darstellungsweise wäre auch für die Gewinnung des Coniferins als Coniferylalkohol aus Wiesenheu oder Kleeheu anzu wenden, ich habe jedoch vorläufig davon abgesehen und mich mit einem qualitativen Nachweis in beiden Futtermitteln begnügt, werde aber nicht versäumen, später einen Versuch zu machen,

[1]) Hartig, Jahrb. f. Förster, 1861, I S. 263.

[2]) Kubel, Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 97, S. 243.

[3]) Tiemann u. Haarmann, Dt. chem. Ges. 1894, S. 608—623.

[4]) Beilstein, Handbuch der Organischen Chemie 1896 II S. 1113.

auf die beschriebene Weise aus den erwähnten Futtermitteln den Coniferylalkohol darzustellen. Läßt man z. B. concr. Schwefelsäure auf Coniferin einwirken, so wird es zersetzt und bildet eine dunkelviolette Lösung, aus der sich beim Verdünnen mit Wasser ein blaues Harz abscheidet. Mit Phenol und concr. Salzsäure befeuchtet, färbt sich Coniferin intensiv blau, eine Färbung, welche bekannterweise Fichtenholz annimmt, wenn es mit Salzsäure durchtränkt und dann mit Phenol zusammengebracht wird, und die offenbar von dem Gehalt des Fichtenholzes an Coniferin herrührt. Mit schmelzendem Kali gibt Coniferin Protocatechusäure.

Es gelang mir nun einerseits durch direkte Behandlung von Wiesenheu- oder Kleeheustengeln mit Phenol und concr. Salzsäure die charakteristische Blaufärbung zu erzielen, andererseits aber auch die gleiche Reaktion zu erhalten, wenn ich die beiden eben erwähnten Futtermittel längere Zeit mit Wasser digerierte und die Reaktion im Saft vornahm. Selbstverständlich ging das nicht ohne weiteres, da ja der Saft von Wiesen- oder Kleeheu zu dunkel gefärbt ist, um eine Reaktion darin erkennen zu können. Ich beseitigte daher erst die störenden Farbstoffe mit Bleiessig, bis ich eine fast wasserhelle Lösung bekam. Das überschüssige Blei fällte ich teils im Kohlensäurestrom, teils mit Kaliumsulfat, also als Carbonat resp. als Sulfat aus, dampfte das Filtrat bis zur Trockne ein und setzte nun Phenol mit concr. Salzsäure zu; nach ganz kurzer Zeit trat die Reaktion ein, nach längerem Stehen war der Boden der weißen Porzellanschale mit einer tiefblauen Flüssigkeitsschicht bedeckt.

Ich muß hier nochmals bemerken, daß ich vorläufig auch nur einen qualitativen Nachweis des Vorkommens von Coniferin in Wiesen- resp. Kleeheu erbringen konnte. Ich bemerkte aber schon an einer früheren Stelle, daß ich später noch den Coniferylalkohol darstellen werde, da ich ziemlich sicher bin, daß das Mengenverhältnis des Coniferins in den erwähnten Futtermitteln durchaus kein geringes ist. Dagegen stützen sich meine bisherigen Befunde auf einen Tierversuch, und außerdem habe ich, wie ich gleich zu zeigen haben werde, durch meine Oxydationsmethode Benzoesäure aus Coniferin dargestellt.

Da Coniferin ein immerhin etwas kostspieliger Artikel ist, begnügte ich mich bis jetzt den qualitativen Nachweis zu führen, daß bei Einwirkung von gepulvertem Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung auf dem kochenden Wasserbade Benzoesäure in nicht unerheblichen Mengen entsteht. Einmal 2,5 g, ein zweites Mal 5,0 g Coniferin in beschriebener Weise oxydiert, ergaben soviel Benzoesäure, daß ich im Reagenscylinder die typischen Niederschläge von Eisen-, Kupfer- und Zinnbenzoat herzustellen vermochte, das benzoesaure Eisen von fleischfarbener, das benzoesaure Kupfer von blauweißer und das benzoesaure Zinn von rötlich-weißer Beschaffenheit. Ob die Oxydation so vollständig war, daß in der Hauptsache wenigstens Benzoesäure gebildet wurde, kann ich bis jetzt noch nicht entscheiden, da ich, wie gesagt, mich vorläufig mit dem allerdings sicheren qualitativen Nachweis begnügte. Die vom Braunstein abfiltrierte Flüssigkeit wurde eingedampft, mit Salzsäure angesäuert und zur Lösung der Benzoesäure mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Petrolätherlösung versetzte ich mit ungefähr demselben Volumen Alkohol, um die ausgeschüttelte Säure besser mit Natronlauge titrieren resp. neutralisieren zu können. Die annähernd neutrale, schwachalkalische Flüssigkeit wurde zur Verjagung des Petroläthers und des Alkohols zur Trockne verdampft, mit Wasser aufgenommen, genau neutralisiert, dann in mehrere Teile geteilt und in diesen die Reaktion vorgenommen. Sollte etwa Vanillin entstanden sein, so würde dieses wohl bei der starken Oxydation in Vanillinsäure übergegangen sein, die aber in Petroläther fast unlöslich ist und auch mit den erwähnten Metallsalzen keine Reaktionen liefert. Ebenso verhält sich auch die Glycovanillinsäure, die beim Erwärmen von Coniferin mit Kaliumpermanganatlösung entstehen kann. Auch Salicylsäure, die eventuell entstehen könnte, ja sogar ziemlich sicher entsteht, ist einerseits in Petroläther fast unlöslich, andererseits gibt sie ja mit Eisenchlorid die charakteristische Violettfärbung. Ich konnte also mit ziemlicher Sicherheit annehmen, daß die erhaltenen Reaktionen auch wirklich von entstandener Benzoesäure herrührten und konnte getrost einen Fütterungsversuch mit Coniferin wagen, wobei sich wohl vermuten ließ, daß auch der Tierkörper eine Oxydation des Coniferins zu

Benzoesäure zustande bringen werde.[1]) Meine Erwartungen wurden denn auch nicht getäuscht. 10 g Coniferin wurden täglich morgens an ein Tier verfüttert, das dasselbe auch ohne Sträuben und, ohne daß die geringsten nachteiligen Folgen zu beobachten gewesen wären, aufnahm. Aus schon erwähntem Grunde, wegen des hohen Preises des Coniferins, mußte ich meinen Versuch auf ein Tier (ich nahm einen der Hammel, die für alle meine Untersuchungen gedient hatten) beschränken, aber das Resultat war während einer Periode von 5 Tagen ausschließlich eines Vorfütterungstages, an welchem keine Hippursäurebestimmung gemacht wurde, so unzweifelhaft, daß man es wohl als vollständig einwandsfrei annehmen kann. Denn während im Mittel der Untersuchungsergebnisse von 4 Tagen mit Grundfütterung (850 g Kleeheu, 50 g Weizenschalen und 10 g Kochsalz) 3,0 g Hippursäure gefunden wurden, stieg bereits die Ausscheidung derselben am ersten Untersuchungstage, nachdem also, wie schon bemerkt, ein Tag als Vorfütterungstag ausgeschaltet war, auf 5,21 g und dann im Laufe der vier folgenden Tage bis auf 6,3 g. Ich hielt es für unnötig, die Periode, während der ein, wenn auch langsames, doch fortgesetztes Steigen der Hippursäureausscheidung stattgefunden hatte, noch weiter fortzusetzen, zumal sich annehmen ließ, daß doch wohl der Höhepunkt der Oxydation eingetreten sei, denn 10 g Coniferin, wie wir es von der Chemischen Fabrik von E. Merck-Darmstadt bezogen hatten, das aber wohl kaum chemisch rein war, da es deutlich nach Vanillin roch, vermögen, nach der Formel berechnet 3,6 g Hippursäure zu bilden. Der Versuch zeigt, daß tatsächlich 3,3 g erzeugt worden sind, daß also annähernd 90 % des Ausnutzungswertes im Tierkörper umgesetzt wurden. Hier möge nun erst wieder eine Zusammenstellung der Zahlenergebnisse folgen, wie ich sie in den letzten beiden Perioden, der

[1]) Da ich bei späteren Versuchen mit Coniferin doch nicht unterlassen wollte, nunmehr eine quantitative Bestimmung der entstandenen Benzoesäure zu unternehmen, so kann ich die Mitteilung hier einfließen lassen, daß ich aus 5,0 g Coniferin 1,1037 g Benzoesäure erzielte. Diese Menge entspricht zwar nicht ganz der im Tierkörper erzeugten, kommt ihr aber schon ziemlich nahe, sodaß ich wohl hoffen darf, im Wiederholungsfalle bei noch intensiverer Oxydation vollständige Übereinstimmung zu erlangen.

Grundration mit Kleeheu und der täglichen Darreichung von 10 g Coniferin, erzielt habe:

VIII. Periode.

850 g Kleeheu + 50 g Weizenschalen + 10 g Kochsalz

Tag	Hippursäure nach unserer Methode g	Hippursäure nach Henneberg g
1	3,1847	— — —
2	3,2639	— — —
3	3,0496	2,0275
4	2,8248	2,6009

IX. Periode.

850 g Kleeheu + 50 g Weizenschalen + 10 g Kochsalz + 10 g Coniferin

1	5,2136	— — —
2	5,4446	5,0030
3	5,6073	5,2737
4	5,9444	— — —
5	6,2950	5,8558

Aus diesen Zahlenreihen ist ersichtlich, daß Coniferin entschieden eine Substanz ist, welche die Hippursäurebildung im Tierkörper ganz erheblich zu steigern vermag, und schließlich ist ja diese Erscheinung auch weiter gar nicht wunderbar, da der Benzolkern bereits darin enthalten ist. Das Coniferin ist das Glycosid des Coniferyalkohols, der sich in ähnlicher Weise, wie das Vanillin, von Benzol ableitet und durch folgende Formel dargestellt werden kann:

$$C_6H_3\begin{cases}OH\\-O\,.\,CH_3\\C_3H_4\,.\,OH\end{cases}$$

das Glycosid ist also nach der Formel

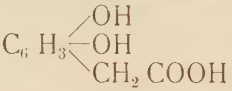
$$C_6H_3\begin{cases}O{-}C_6H_{11}O_5\ (\text{Glycose})\\-O\,.\,CH_3\\C_3H_4\,.\,OH\end{cases}$$

zusammengesetzt, wozu schließlich noch 2 Mol. Krystallwasser treten.

Ich glaube daher somit den positiven Nachweis geliefert zu haben, daß das Coniferin die Hippursäureausscheidung in ganz erheblicher Weise zu erhöhen vermag; es erübrigt nur noch, durch Herstellung eines chemisch reinen Körpers, beispielsweise des Coniferylalkohols, aus Wiesen- resp. aus Kleeheu den defi-

nitiven Beweis zu erbringen, daß die in diesen Futtermitteln aufgetretene Coniferin-Reaktion mit Phenol und Salzsäure oder concr. Schwefelsäure tatsächlich von Coniferin herrührt, und um festzustellen, in welchen Mengenverhältnissen sich dasselbe in den erwähnten Futterstoffen vorfindet. Da aber die hierzu erforderlichen Arbeiten momentan zu zeitraubend sein würden, muß ich mir, wie bereits erwähnt, die Ausführung derselben für die nächste Zukunft vorbehalten.

Eine höchst interessante Erscheinung jedoch, auf die ich später noch zurückzukommen haben werde, die ich aber bei dieser Arbeit nicht ganz unerwähnt lassen möchte, war die, daß der Harn des Versuchstieres, der anfangs ganz normale Beschaffenheit zeigte, sich bei längerem Stehen an der Luft erst karmoisinrot, dann schließlich braun bis schwarz färbte, zumal, wenn man größere Mengen Harn auf dem Wasserbade auf ein kleineres Volumen eindampfte. Da sich der Farbstoff aber erst durch Oxydation an der Luft bildet, auf Zusatz von irgend einer verdünnten Mineralsäure verschwindet, dagegen bei Zusatz von überschüssigem Alkali wieder auftritt, gelangte ich zu der Annahme, daß es die von Baumann und Wolkow im Alkapton-Harn entdeckte Homogentisinsäure (Oxyphenylessigsäure) von der Formel



ist. Da aber die Auffindung dieser Säure mit meiner Arbeit in keinem unmittelbaren Zusammenhang steht, will ich nur noch hinzufügen, daß nach eingehender Untersuchung dieser interessanten Tatsache nähere Mitteilungen darüber folgen werden.

Die Elementaranalyse von aus Harn einerseits, aus Wiesenheu andererseits hergestellter Benzoesäure ergab folgende Zahlen:

Berechnet für C_6H_5COOH: 68,85 % C
4,92 % H

Benzoesäure aus Harn dargestellt:
68,72 % C
4,98 % H

Benzoesäure aus Wiesenheu dargestellt:
67,98 % C
4,98 % H

Das Defizit an Kohlenstoff ergibt sich aus der Verunreinigung der Benzoesäure durch Spuren von Salicylsäure.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

Hiermit glaube ich alle wesentlichen Resultate meiner bisherigen Untersuchungen gegeben zu haben, und wenn daraus auch noch nicht hervorgeht, daß die ganze Frage über die Bildung der Hippursäure im Tierkörper definitiv abgeschlossen ist, so sind doch manche interessante Anknüfungspunkte gegeben, die zu weiteren Forschungen Anlaß geben können. Abgesehen von einigen weniger ins Gewicht fallenden Ergebnissen, ist kurz zusammengefaßt folgendes aus meinen Versuchen zu entnehmen:

1. Die Brauchbarkeit unserer neuen Methode hat sich bei meinen sämtlichen Untersuchungen in vollstem Maße bestätigt.

2. Die bisher giltige Ansicht, daß Eiweiß oder Kohlenhydrate irgend welchen wesentlichen Einfluß auf die Bildung der Hippursäure haben, resp. daß durch die erwähnten Substanzen dieselbe eine sehr bedeutende Depression erführe, muß man für die Zukunft fallen lassen. Eiweiß vermag durch Hinzuschießen seiner eigenen aromatischen Zerfallprodukte die Bildung von Benzoesäure resp. die Abscheidung von Hippursäure, wenigstens in geringem Maße, zu erhöhen. Kohlenhydrate scheinen nur insofern von Einfluß zu sein, als sie eiweißsparend wirken, und etwaige Zersetzungsprodukte des Eiweißes aromatischer Natur sich der Oxydation zu Benzoesäure entziehen.

3. Die Muttersubstanz der Hippursäure ist zu einem großen Teile wasserlöslich, scheint aber durch Weiterbehandlung mit kalter 1,5 prozentiger Schwefelsäure nicht mehr beeinflußt zu werden.

4. Kleeheu vermag in der Tat nur geringere Mengen von Hippursäure zu erzeugen. Jedoch findet diese Erscheinung ihre Erklärung darin, daß die für die Bildung von Benzoesäure in Frage kommenden aromatischen Substanzen im Kleeheu zum großen Teil unverdaulicher Natur sind. Es gewinnt die Annahme an Wahrscheinlichkeit, daß sich der alte Standpunkt von Meißner und Shepard bestätigt, die Rohfaser, und speziell von dieser die »inkrustierenden Substanzen«, birgt, wenigstens einen Teil der fraglichen Verbindungen, und da die Rohfaser des Kleeheus be-

kanntlich unverdaulicher ist, als die beispielsweise des Wiesenheus, dürfte vielleicht darin eine Erklärung gefunden sein.

5. Es gibt eine Möglichkeit, um zwischen den Oxydationsvorgängen im Tierkörper und denen außerhalb desselben durch Oxydationsversuche mit künstlichen Oxydationsmitteln im Laboratorium eine Parallele zu ziehen. Durch die Behandlung der Futtermittel mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung werden etwa in ihnen enthaltene aromatische Verbindungen in Benzoesäure überführt, so daß bei diesem Prozeß nur Spuren von Salizylsäure entstehen. Wenn auch durch diese Manipulation keine Resultate erzielt werden, die auf absolute Genauigkeit Anspruch machen, so lassen sich doch nicht zu unterschätzende Vergleichszahlen ermitteln. Vor allem ist dabei zu bemerken, daß es durch meine Versuche zum ersten Male gelungen ist, den definitiven Nachweis von Körpern der aromatischen Reihe in Wiesenheu etc. zu führen, und daß ich **fast chemisch reine** Benzoesäure aus Futtermitteln dargestellt habe.

6. Im Coniferin scheint eine der Verbindungen gefunden zu sein, welche zur Bildung von Hippursäure im Tierkörper Anlaß geben. Die charakteristischen Reaktionen passen darauf, und ein Fütterungsversuch hat die Annahme bestätigt. Es ist die Auffindung des Coniferins, ähnlich wie die der Chinasäure, vielleicht deswegen von Bedeutung, weil dadurch bewiesen werden kann, daß tatsächlich aromatische Verbindungen in gewissen Futtermitteln präformiert enthalten sind.

Einige noch nicht beendete Untersuchungen, den definitiven Beweis des Vorhandenseins von aromatischen Verbindungen in der Rohfaser betreffend und über den bei Fütterung von Coniferin entstandenen Harnfarbstoff, den ich vorläufig als Auftreten von Homogentisinsäure gedeutet habe, werden folgen, sobald die diesbezüglichen Arbeiten darüber abgeschlossen sind.

Vor allem aber sei es mir an dieser Stelle gestattet, meinem langjährigen, hochverehrten Lehrer und Berater, Herrn Professor Dr. Th. Pfeiffer, für die Anregung zu vorstehender Arbeit, für seine wohlwollende Unterstützung, die er mir immer gewährt, und für das rege Interesse, welches er stets bekundet hat, meinen warm empfundenen Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich, Richard Riecke, lutherischer Konfession, wurde am 17. März 1876 zu Heerte im Herzogtum Braunschweig geboren. Meine Schulbildung erhielt ich auf dem Gymnasium zu Goslar am Harz, wo ich mir das Reifezeugnis erwarb. Wintersemester 1895—1898 studierte ich technische Chemie an den technischen Hochschulen zu Hannover und Braunschweig, dann nach neunmonatlicher praktischer Tätigkeit an der Zuckerfabrik Cönnern a. Saale zwei Semester Chemie an der Universität Rostock. Seit April 1900 stehe ich als Assistent unter der Leitung des Herrn Prof. Dr. Pfeiffer, zuerst an der landwirtschaftlichen Versuchsstation der Universität Jena, darauf am agrikulturchemischen und bakteriologischen Institut der Universität Breslau, wo ich während der letzten drei Semester noch immatrikuliert war. Das Examen rigorosum bestand ich am 29. Juli 1903.

Für meine wissenschaftliche Ausbildung bin ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Pfeiffer verpflichtet, der mir Gelegenheit gab, mich an einer Reihe wissenschaftlicher Arbeiten zu beteiligen; ihm gebührt mein ganz besonderer Dank. Ich hörte während meiner Studienzeit die Vorlesungen folgender Professoren und Dozenten in Hannover, Braunschweig, Rostock und Breslau: Baumgartner, Beckurts, Behrend, Dieterizi, Frese, Frech, Kiepert, Luedecke, Meyer, Michaelis, Müller, Neumann, Pfeiffer, Rinne, Rodenberg, Runge, Seubert, Stoermer, Volz, Weber, Wernicke.

Ihnen allen danke ich für die Förderung während meiner Studienzeit.

Thesen:

1. Kohlenhydrate resp. Eiweiß üben keinen wesentlichen Einfluß auf die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus aus.

2. Nährstoffbedürfnis und Düngerbedürfnis dürfen nicht verwechselt werden.

3. Die Atomwärme für die verschiedenen chemischen festen Elemente hat ungefähr denselben Wert.

4. Der Kohlenstoffreichtum der Kohle ist nicht lediglich durch das geologische Alter derselben bedingt.